

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP

EXEMPLAR REVISADO

Data de entrada no Serviço: 26 / 04 / 01

Ass.: Guilherme

**INFLUÊNCIA DO TIPO DE SUBSTRATO NA
DINÂMICA DE FORMAÇÃO DO BIOFILME EM
MATRIZES DE ESPUMA DE POLIURETANO**



Rogers Ribeiro

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Zaiat

DEDALUS - Acervo - EESC



31100017378

São Carlos
2001

Class.	TESE - EESC
Curr.	5069
Tombo	0092/01

st 1177430

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca - EESC/USP

R484i Ribeiro, Rogers
Influência do tipo de substrato na dinâmica de
formação do biofilme em matrizes de espuma de
poliuretano / Rogers Ribeiro. -- São Carlos, 2001.


Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de
São Carlos-Universidade de São Paulo, 2001.
Área: Hidráulica e Saneamento.
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zaiat.


1. Biomassa imobilizada. 2. Polímeros
extracelulares. 3. Espuma de poliuretano. 4. Formação
de biofilme anaeróbio. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

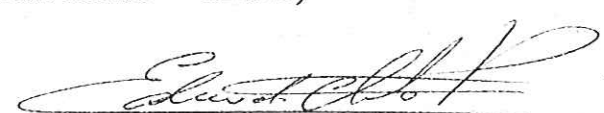
Candidato: Engenheiro **ROGERS RIBEIRO**

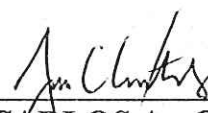
Dissertação defendida e aprovada em 23-03-2001
pela Comissão Julgadora:


Prof. Doutor **MARCELO ZAIAT (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)


Prof. Titular **EUGENIO FORESTI**
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)


Prof. Doutor **CARLOS AUGUSTO DE LEMOS CHERNICHIARO**
(Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG)


Prof. Associado **EDUARDO CLETO PIRES**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Engenharia (Hidráulica e Saneamento)


JOSÉ CARLOS A. CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da EESC

*Aos meus pais, Lázaro e Maria,
por todo amor e apoio.*

*Ao meu grande amor,
Samantha.*

AGRADECIMENTOS

A Marcelo Zaiat, pela amizade, orientação, incentivo e dedicação, e principalmente por ser um exemplo de honestidade e competência.

À Maria Bernadete Varesche, pela amizade, co-orientação, atenção e valioso aprendizado.

Ao Dr. Nelson Gallo, do Instituto de Física de São Carlos – USP, pelo excelente trabalho desenvolvido na microscopia eletrônica de varredura, de fundamental importância no desenvolvimento desta dissertação.

Ao Chico Vela e ao Olímpio “Criança”, pela amizade e pela acolhida em São Carlos.

Aos amigos André “Mineiro”, Valmir “Valking”, Eduardo, Douglas, Mércia, Fernandão, Cláudio Antônio, Márcio Barboza, Selma e Sônia.

A Arnaldo, Fazzolo, Gunther, Neyson, Luciana, André Campos, Marilu, Eduardo “Chuchu”, Nélia, Juliana, Giovana, Camila, Ricardo, Ivana e Kênia e tantos outros que tive o prazer de conhecer e conviver ao menos um pouco.

Aos cearenses, paraibanos e paraenses pela convivência e pelo intercâmbio cultural e futebolístico.

A prof^a Elisabeth Moraes, Maria Ângela Talaricco e Eloisa Pozzi pela grande ajuda no laboratório.

À Dr^a Valéria Del Nery pelo lodo fornecido.

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

“... O único sentido das cousas
É elas não terem sentido íntimo nenhum.
Não acredito em Deus porque nunca o vi.
Se ele quisesse que eu acreditasse nele,
Sem dúvida que viria falar comigo
E entraria pela minha porta dentro
Dizendo-me, Aqui-estou!

(Isto é talvez ridículo aos ouvidos
De quem, por não saber o que é olhar para as
cousas,
Não compreende quem fala delas
Com o modo de falar que reparar para elas
ensina.)

Mas se Deus é as flores e as árvores
E os montes e o sol e o luar,
Então acredito nele,
Então acredito nele a toda a hora,
E a minha vida é toda uma oração e uma missa,
E uma comunhão com os olhos e pelos ouvidos. ...”

(Alberto Caeiro [heterônimo de Fernando Pessoa])

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3. Revisão Bibliográfica	5
3.1 Substratos	5
3.1.1. Carboidratos	5
3.1.2. Lipídios	6
3.1.3. Proteínas	7
3.1.4. Esgoto sanitário	9
3.2. Biofilme	10
3.2.1. Filme condicionante	12
3.2.2. Colonização de Suportes Inertes por Microorganismos	13
3.2.3. Fases da Colonização de Suportes	13
3.2.4. Aderência Inicial	14
3.3. Ecologia Microbiana	20
3.3.1. Domínio Bactéria	20
3.3.2. Diversidade Bacteriana	20
3.3.3. Domínio Archaea	23
3.3.5. Domínio Eukarya – Reino Protista – Sub-reino Protozoa	26

3.4. Formação e Caracterização Microbiológica do Biofilme Anaeróbio	28
3.5. Considerações Finais	33
4. Material e Métodos	34
4.1. Aparato Experimental	34
4.2. Suporte de Imobilização	35
4.3. Inóculo	36
4.4. Substratos	36
4.5. Métodos Analíticos	38
4.6. Procedimento Experimental	38
4.6.1. Operação do Sistema de Reatores Diferenciais	38
4.6.2. Caracterização Microbiológica do Biofilme Anaeróbio	40
4.6.3. Quantificação da Biomassa Aderida	40
4.6.4. Quantificação de Polímeros Extracelulares Excretados	42
4.6.5. Identificação de Polímeros Extracelulares Excretados	44
5. Resultados e Discussão	46
5.1. Monitoramento do Sistema	46
5.2. Crescimento de Biomassa e Excreção de Polímeros	49
5.2.1. Quantificação da Biomassa Aderida	50
5.2.2. Quantificação dos Polímeros Extracelulares em Relação à Biomassa Aderida	57
5.2.3. Quantificação dos Polímeros Extracelulares em Relação às Matrizes de Poliuretano	71
5.3 Caracterização morfológica do lodo utilizado como inóculo	85
5.4 Formação e evolução do biofilme anaeróbio em matrizes de poliuretano	87
5.5 Dinâmica de colonização do biofilme anaeróbio em matrizes de poliuretano em reatores utilizando glicose como substrato	89
5.5.1. - 4º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato	89

5.5.2. - 7º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato	91
5.5.3. - 10º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato	93
5.5.4. - 13º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato	96
5.5.5. - 16º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato	99
5.5.6. - 21º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato	101
5.5.7. - 24º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato	103
5.6 Dinâmica de colonização do biofilme anaeróbico em matrizes de poliuretano em reatores utilizando amido como substrato	107
5.6.1. - 4º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato	107
5.6.2. - 7º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato	109
5.6.3. - 10º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato	111
5.6.4. - 13º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato	114
5.6.5. - 16º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato	116
5.6.6. - 21º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato	118
5.6.7. - 24º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato	120
5.7 Dinâmica de colonização do biofilme anaeróbico em matrizes de poliuretano em reatores utilizando óleo de soja como substrato	124
5.7.1. - 4º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato	125
5.7.2. - 7º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato	127
5.7.3. - 10º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato	129
5.7.4. - 13º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato	131
5.7.5. - 16º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato	133

5.7.6. - 21º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato	135
5.7.7. -24º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato	137
5.8 Dinâmica de colonização do biofilme anaeróbio em matrizes de poliuretano em reatores utilizando extrato de carne como substrato.	141
5.8.1. - 4º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato.	141
5.8.2. - 7º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato.	143
5.8.3. - 10º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato.	145
5.8.4. - 13º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato.	148
5.8.5. - 16º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato.	150
5.8.6. - 21º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato.	152
5.8.7. - 24º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato.	154
5.9 Dinâmica de colonização do biofilme anaeróbio em matrizes de poliuretano em reatores utilizando esgoto sintético como substrato	158
5.9.1. - 4º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato	158
5.9.2. - 7º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato	160
5.9.3. - 10º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato	162
5.9.4. - 13º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato	164

5.9.5. - 16º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato	166
5.9.6. - 21º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato	168
5.9.7. - 24º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato	170
5.10. Identificação de polímeros extracelulares	174
5.11. Discussão geral dos resultados – influência do substrato na aderência de microorganismos	176
6. Conclusões	179
7. Sugestões	181
8. Referências bibliográficas	182

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1: Ação da lipase na hidrólise de lipídios (a); Ação das fosfolipases na hidrólise de fosfolipídios (b). 7
- Figura 3.2: Seqüência das etapas de colonização de superfícies por microorganismos (van LOOSDRECHT et al. 1990). 13
- Figura 3.3: Gráficos de Energia Livre de Gibbs em função da distância entre uma bactéria e uma superfície plana. Representação esquemática para (a) baixos, (b) intermediários, e (c) altos valores de força iônica (van LOOSDRECHT et al., 1990). 15
- Figura 3.4: (A) Interação repulsiva entre superfícies cobertas por polímeros – efeito estérico; (B) fixação através ligações entre duas superfícies carregadas negativamente; GA interações de Van der Waals; GE interações eletrostáticas; GS interações estéricas; GB interações devido às ligações poliméricas; GTOT energia livre de Gibbs; H distância entre as duas superfícies; \square espessura média da camada de recobrimento polimérico. 16
- Figura 3.5: Processo de aderência de microorganismos através de fixação excreção de polímeros (Costerton et al., 1978). 19
- Figura 3.6: Representação radial dos grupos filogenéticos de Bactéria conhecidos em 1987 (figura menor baseada em Woese, 1987) e em 1997 (baseado em Hugenholtz et al., 1998a). Os setores em cunha indicam a ocorrência de duas ou mais seqüências representativas naquele nível de radiação. 21
- Figura 3.7: Árvore filogenética do Domínio Archaea, baseada na análise de seqüências do RNAr 16S (Madigan et al., 1997). 24
- Figura 4.1: (a) Desenho do reator diferencial; (b) Aparato Experimental (1. Reatores diferenciais; 2. Recipiente sob agitação; 3. Banho de gelo; 4. Agitador magnético; 5. Amostrador de substrato; 6. Trocador de calor; 7. Bomba; 8. Câmara termostatizada). 35
- Figura 4.2: Fluxograma do procedimento experimental para a quantificação da biomassa aderida às matrizes de poliuretano. 42
- Figura 4.3: Fluxograma do procedimento experimental para a quantificação de polímeros extracelulares excretados pela biomassa aderida às matrizes de poliuretano. 44
- Figura 5.1: Concentração de matéria orgânica (medida em termos de DQO – mg/L), para cada batelada, para cada substrato utilizado 47

Figura 5.2: Valores de alcalinidade a bicarbonato (medida em termos de mg CaCO ₃ /L), para cada batelada, para os substratos utilizados.	48
Figura 5.3: Concentração de ácidos voláteis (medida em termos de mg CH ₃ COOH/L), para cada batelada, para os substratos utilizados	48
Figura 5.4: Massa de sólidos voláteis totais por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato.	51
Figura 5.5: Massa de sólidos voláteis totais por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato.	52
Figura 5.6: Massa de sólidos voláteis totais por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato.	52
Figura 5.7: Massa de sólidos voláteis totais por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato.	53
Figura 5.8: Massa de sólidos voláteis totais por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato.	54
Figura 5.9: Massa de sólidos voláteis totais por grama de espuma, ao longo tempo, para os substratos utilizados.	55
Figura 5.10: Variação da velocidade de colonização da espuma de poliuretano para os substratos utilizados.	56
Figura 5.11: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato.	58
Figura 5.12: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato.	59
Figura 5.13: Velocidade específica de produção de polímeros (n carboidratos; s proteínas), ao longo tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato.	60
Figura 5.14: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato.	60
Figura 5.15: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato.	61
Figura 5.16: Velocidade específica de produção de polímeros (n carboidratos; s proteínas), ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato.	62

- Figura 5.17: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato. 62
- Figura 5.18: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato. 63
- Figura 5.19: Velocidade específica de produção de polímeros (n carboidratos; s proteínas), ao longo tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato. 64
- Figura 5.20: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato. 64
- Figura 5.21: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato. 65
- Figura 5.22: Velocidade específica de produção de polímeros (n carboidratos; s proteínas), ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato. 66
- Figura 5.23: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. 66
- Figura 5.24: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. 67
- Figura 5.25: Velocidade específica de produção de polímeros (n carboidratos; s proteínas), ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. 68
- Figura 5.26: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para os substratos utilizados. 69
- Figura 5.27: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para os substratos utilizados. 69
- Figura 5.28: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato. 72
- Figura 5.29: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato. 73
- Figura 5.30: Velocidade de produção de polímeros (n carboidratos; s proteínas), por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato. 74
- Figura 5.31: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato. 74

- Figura 5.32: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato. 75
- Figura 5.33: Velocidade de produção de polímeros (n carboidratos; s proteínas), por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato. 76
- Figura 5.34: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato. 76
- Figura 5.35: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato. 77
- Figura 5.36: Velocidade de produção de polímeros (n carboidratos; s proteínas), por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato. 78
- Figura 5.37: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato. 78
- Figura 5.38: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato 79
- Figura 5.39: Velocidade de produção de polímeros (n carboidratos; s proteínas), por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato. 80
- Figura 5.40: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. 80
- Figura 5.41: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. 81
- Figura 5.42: Velocidade de produção de polímeros (n carboidratos; s proteínas), por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. 82
- Figura 5.43: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma, ao longo tempo, para os substratos utilizados. 83
- Figura 5.44: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma, ao longo tempo, para os substratos utilizados. 83
- Figura 5.45: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e de epifluorescência do lodo granulado utilizado como inoculo. 86
- Figura 5.46: Padrões de imobilização no biofilme, observados sob microscopia eletrônica de varredura, para reatores utilizando diferentes substratos. 88

- Figura 5.47: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 4º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato. 90
- Figura 5.48: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 7º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato. 92
- Figura 5.49: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 10º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato. 94
- Figura 5.50: Observações sob microscopia eletrônica de varredura dos polímeros extracelulares referentes às amostras retiradas dos reatores provenientes do ciclo utilizando glicose como substrato. 95
- Figura 5.51: Observações sob microscopia eletrônica de varredura da fase inicial de colonização da espuma para os reatores provenientes do ciclo utilizando glicose como substrato. 96
- Figura 5.52: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 13º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato. 98
- Figura 5.53: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 16º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato. 100
- Figura 5.54: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 21º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato. 102
- Figura 5.55: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 24º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato. 104
- Figura 5.56: Frequência de aparecimento das morfologias, ao longo do tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato. 106
- Figura 5.57: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 4º dia do ciclo, utilizando amido como substrato. 108

- Figura 5.58: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 7º dia do ciclo, utilizando amido como substrato. 110
- Figura 5.59: Observações sob microscopia eletrônica de varredura da fase inicial de colonização da espuma para os reatores provenientes do ciclo utilizando amido como substrato. 112
- Figura 5.60: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 10º dia do ciclo, utilizando amido como substrato. 113
- Figura 5.61: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 13º dia do ciclo, utilizando amido como substrato. 115
- Figura 5.62: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 16º dia do ciclo, utilizando amido como substrato. 117
- Figura 5.63: Observações sob microscopia eletrônica de varredura, referentes à colonização da espuma, para o ciclo utilizando amido como substrato. 118
- Figura 5.64: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 21º dia do ciclo, utilizando amido como substrato. 119
- Figura 5.65: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 24º dia do ciclo, utilizando amido como substrato. 121
- Figura 5.66: Frequência de aparecimento das morfologias, ao longo do tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato. 123
- Figura 5.67: Camada de óleo de soja recobrindo o biofilme anaeróbio. 124
- Figura 5.68: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 4º dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato. 126

- Figura 5.69: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 7º dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato. 128
- Figura 5.70: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 10º dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato. 130
- Figura 5.71: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 13º dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato. 132
- Figura 5.72: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 16º dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato. 134
- Figura 5.73: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 21º dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato. 136
- Figura 5.74: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 24º dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato. 138
- Figura 5.75: Frequência de aparecimento das morfologias, ao longo do tempo, para o ciclo utilizando óleo de soja como substrato. 140
- Figura 5.76: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 4º dia do ciclo, utilizando extrato de carne como substrato. 142
- Figura 5.77: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 7º dia do ciclo, utilizando extrato de carne como substrato. 144
- Figura 5.78: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 10º dia do ciclo, utilizando extrato de carne como substrato. 146
- Figura 5.79: Observações sob microscopia eletrônica de varredura da fase inicial de colonização da espuma para os reatores provenientes do ciclo utilizando extrato de carne como substrato. 147

- Figura 5.80: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 13º dia do ciclo, utilizando extrato de carne como substrato. 149
- Figura 5.81: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 16º dia do ciclo, utilizando extrato de carne como substrato. 151
- Figura 5.82: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura referentes às amostras do reator retirado no 21º dia do ciclo utilizando extrato de carne como substrato. 153
- Figura 5.83: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura referentes às amostras do reator retirado no 24º dia do ciclo utilizando extrato de carne como substrato. 155
- Figura 5.84: Frequência de aparecimento das morfologias, ao longo do tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato. 157
- Figura 5.85: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 4º dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato. 159
- Figura 5.86: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 7º dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato. 161
- Figura 5.87: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 10º dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato. 163
- Figura 5.88: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 13º dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato. 165
- Figura 5.89: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 16º dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato. 167
- Figura 5.90: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 21º dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato. 169

Figura 5.91: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 24º dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato. . 171

Figura 5.92: Freqüência de aparecimento das morfologias, ao longo do tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. 173

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Concentrações de substratos correspondentes a DQO de 500 mg/L.	36
Tabela 4.2: Concentração de sais na água residuária sintética.	37
Tabela 4.3: Composição do esgoto sintético para concentração de 500 DQOmg/L.	37
Tabela 5.1: Dados de monitoramento do afluente para os diferentes substratos utilizados na alimentação dos reatores.	46
Tabela 5.2: Dados referentes ao crescimento da biomassa e à excreção de polímeros para a etapa utilizando glicose como substrato.	49
Tabela 5.3: Dados referentes ao crescimento da biomassa e à excreção de polímeros para a etapa utilizando amido como substrato.	49
Tabela 5.4: Dados referentes ao crescimento da biomassa e à excreção de polímeros para a etapa utilizando óleo como substrato.	50
Tabela 5.5: Dados referentes ao crescimento da biomassa e à excreção de polímeros para a etapa utilizando extrato de carne como substrato.	50
Tabela 5.6: Dados referentes ao crescimento da biomassa e à excreção de polímeros para a etapa utilizando esgoto sintético como substrato.	50
Tabela 5.7: Valores dos parâmetros do modelo ajustado para a colonização das espumas utilizando glicose como substrato.	51
Tabela 5.8: Valores dos parâmetros do modelo ajustado para a colonização das espumas utilizando amido como substrato.	52
Tabela 5.9: Valores dos parâmetros do modelo ajustado para a colonização das espumas utilizando óleo de soja como substrato.	53
Tabela 5.10: Valores dos parâmetros do modelo ajustado para a colonização das espumas utilizando extrato de carne como substrato.	53
Tabela 5.11: Valores dos parâmetros do modelo ajustado para a colonização das espumas utilizando esgoto sintético como substrato.	54
Tabela 5.12: Dados referentes à velocidade média e máxima de crescimento da biomassa para os diversos substratos.	56

- Tabela 5.13: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando glicose como substrato. 58
- Tabela 5.14: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando glicose como substrato. 59
- Tabela 5.15: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis, ao longo do ciclo, utilizando amido como substrato. 61
- Tabela 5.16: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando amido como substrato. 61
- Tabela 5.17: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por 63
- Tabela 5.18: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando óleo de soja como substrato. 63
- Tabela 5.19: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando extrato de carne como substrato. 65
- Tabela 5.20: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando extrato de carne como substrato. 65
- Tabela 5.21: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. 67
- Tabela 5.22: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. 67
- Tabela 5.23: Dados referentes à velocidade específica de produção de polímeros para os diversos substratos. 71

- Tabela 5.24: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando glicose como substrato. 72
- Tabela 5.25: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando glicose como substrato. 73
- Tabela 5.26: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando amido como substrato. 75
- Tabela 5.27: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando amido como substrato. 75
- Tabela 5.28: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando óleo de soja como substrato. 77
- Tabela 5.29: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando óleo de soja como substrato. 77
- Tabela 5.30: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando extrato de carne como substrato. 79
- Tabela 5.31: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando extrato de carne como substrato. 79
- Tabela 5.32: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. 81
- Tabela 5.33: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. 81
- Tabela 5.34: Dados referentes à velocidade de produção de polímeros por grama de espuma para os diversos substratos. 82

Tabela 5.35: Morfologias dos microorganismos presentes nos reatores ao longo do ciclo alimentado com glicose.	105
Tabela 5.36: Morfologias dos microorganismos presentes nos reatores ao longo do ciclo alimentado com amido.	122
Tabela 5.37: Morfologias dos microorganismos presentes nos reatores ao longo do ciclo alimentado com óleo de soja.	139
Tabela 5.38: Morfologias dos microorganismos presentes nos reatores ao longo do ciclo alimentado com extrato de carne.	156
Tabela 5.39: Morfologias dos microorganismos presentes nos reatores ao longo do ciclo alimentado com esgoto sintético.	172

ABREVIATURAS

AB – alcalinidade a bicarbonato

AVT – ácidos voláteis totais

BRS – bactéria(s) redutora(s) de sulfato

CRF – centrifugação regular com formaldeído

DNA – ácido desoxirribonucleico

DQO – demanda química de oxigênio

EDTA – ácido etileno-diaminatetraacético

G+C – guanina e citosina

MEV – microscopia eletrônica de varredura

PEC – polímeros extracelulares

PTFE – politetrafluoretileno

RHALF – reator horizontal anaeróbio de leito fixo

RNA – ácido ribonucleico

RRNA – ácido ribonucleico recombinante

SAB – soroalbumina bovina

SSV – sólidos suspensos voláteis

SST – sólidos suspensos totais

ST – sólidos totais

SVT – sólidos voláteis totais

UASB – upflow anaerobic sludge bed reactor (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo)

SÍMBOLOS

A – área da seção transversal do reator

C_z – força iônica

G_a – energia livre de Gibbs (forças de Van der Waals)

G_e – energia livre de Gibbs (interações eletrostáticas)

G_{tot} - energia livre de Gibbs total

H – distância entre a superfície da partícula e a interface líquido-sólido

P_0 – massa original da cápsula de porcelana

P_1 – massa da cápsula+sólidos após permanência na estufa

P_2 - massa da cápsula+sólidos após permanência na mufla

P_{E1} – massa da espuma limpa após permanência na estufa

Q – vazão de líquido

$V_{média}$ – velocidade média de colonização

$V_{máxima}$ – velocidade máxima de colonização

ε - porosidade do leito

δ - espessura média da camada de recobrimento polimérico

RESUMO

RIBEIRO, R. *Influência do Tipo de Substrato na Dinâmica de Formação do Biofilme em Matrizes de Espuma de Poliuretano*. São Carlos, 2001. 193p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Este projeto estudou a influência do substrato na dinâmica do processo de formação do biofilme em espuma de poliuretano, em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo diferenciais, alimentados com extrato de carne, glicose, amido, lipídeos e esgoto sanitário sintético. O estudo consistiu em acompanhar a colonização das matrizes de espuma, ao longo do tempo, em relação a quantidade de biomassa acumulada, polímero extracelular produzido e características morfológicas das células presentes nos suportes retirados dos reatores diferenciais. O uso dessas técnicas permitiu o melhor entendimento do processo de aderência, além da verificação da composição morfológica e a estrutura do biofilme aderido ao suporte, possibilitando correlacionar a ocorrência de determinadas morfologias com cada etapa da colonização observada. A influência do substrato na dinâmica de aderência foi verificada devido aos diferentes padrões de colonização encontrados. Foi observada uma grande variabilidade morfológica em relação ao substrato utilizado. Todavia, uma grande ocorrência de organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp foi verificada em todos os ciclos, principalmente em relação a *Methanosarcina* sp. O fenômeno de excreção de polímeros pareceu ser de fundamental importância no processo de colonização de matrizes de poliuretano, estando vinculado provavelmente à fixação das células aos suportes. A produção de polímeros, na etapa de aderência inicial, apresentou comportamento diferenciado para cada substrato utilizado. De acordo com os modelos propostos e as análises de microscopia eletrônica de varredura, verificou-se que os polímeros extracelulares podem estar ligados ao entupimento de reatores de leito fixo, permanecendo no interior dos suportes e nos interstícios do leito, causando problemas operacionais. As rápidas partidas observadas em trabalhos utilizando reatores de leito fixo e espuma de poliuretano como suporte podem estar vinculadas à rápida aderência dos organismos em todos os ciclos estudados.

Palavras-chave: Biomassa imobilizada; Polímeros extracelulares; Espuma de poliuretano; Formação de biofilme anaeróbio.

ABSTRACT

RIBEIRO, R. *Influence of the substrate on the biofilm formation onto polyurethane foam matrices*. São Carlos, 2001. 193p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

This work focused on the influence of the type of substrate on the process of biofilm formation onto polyurethane foam matrices, in differential horizontal anaerobic immobilized sludge reactors, fed with meat extract (protein), glucose, starch, lipid and synthetic domestic wastewater. It consisted of accompanying the colonization of foam matrices with time, regarding to biomass amount, extracellular polymers produced and the morphological characteristics of the cells present on the supports packed in the differential reactors. These techniques permitted a better understanding of the adhesion process, besides a verification of the morphological composition and the structure of the biofilm attached to the support, making possible a correlation of the particular morphologies occurrences with each colonization step. The influence of the substrate was verified due to the different colonization patterns found. It was observed considerable morphological variety depending on the substrate utilized. However, the presence of *Methanosaeta* sp.-like organisms was often verified in all cycles, specially *Methanosarcina* sp. The excretion of polymers seemed to be crucial in the colonization process of the polyurethane matrices, being probably related to the cell fixation on the support. The polymeric production, in the initial adhesion step, showed a particular behavior for each substrate employed. According to the proposed models and the scanning electronic microscopy analysis, it was verified that the extracellular polymers can be related to the clogging of the fixed-bed reactors, as it keeps into the supports and the bed interstices, causing operational problems. The fast start-ups observed in works using fixed-bed reactors and polyurethane foam as support can be related to the fast cell adhesion during all cycles studied.

Keywords: Immobilized biomass; Extracellular polymers; Polyurethane foam; Anaerobic biofilm formation.

1. INTRODUÇÃO

No processo de seleção da configuração de reatores, a existência de condições favoráveis é um fator primordial para a imobilização de biomassa ativa e sua satisfatória retenção no interior do reator anaeróbio, uma vez que a não agregação ou a perda de lodo já imobilizado com o efluente influencia de maneira decisiva o desempenho do tratamento (KATO et al., 1999).

O consórcio microbiano em tratamentos anaeróbios executa um complexo processo envolvendo muitas classes de microorganismos e várias etapas intermediárias de degradação. De maneira simplificada, o processo anaeróbio de degradação de compostos complexos se dá, primeiramente, através da hidrólise desses substratos, transformando-os em compostos orgânicos mais simples para, em seguida, serem fermentados a ácidos voláteis pelas bactérias acidogênicas. Os ácidos voláteis com cadeia contendo mais de 2 carbonos são então convertidos a acetato e H_2 pelas bactérias acetogênicas. Finalmente o acetato e o H_2 são convertidos a metano pelas arqueas metanogênicas (McCARTY & SMITH, 1986).

Há um profundo sinergismo entre os microorganismos alocados na forma de grânulos ou aderidos a suportes. Esta agregação peculiar otimiza a cooperação entre os organismos constituintes do biofilme devido à redução da distância para a transferência de produtos metabólicos (SPEECE, 1996).

Segundo LETTINGA (1995), a chave para o desenvolvimento de biotecnologias mais avançadas no tratamento de resíduos está na imobilização dos microorganismos constituintes do processo. Segundo o autor, os tempos de retenção celular necessários, em sistemas anaeróbios de tratamento, só podem ser obtidos mediante a imobilização da biomassa. No entanto, não basta apenas imobilizar o microorganismo, mas sim oferecer condições adequadas para que o consórcio microbiano se desenvolva de maneira equilibrada. A necessidade da utilização de altos tempos de retenção celular se dá devido à existência de várias reações sintróficas de conversão na digestão anaeróbia, minimizando o efeito negativo de altas concentrações de intermediários específicos.

Biorreatores com biomassa imobilizada vêm sendo usados no tratamento de águas residuárias, obtendo bom desempenho com grande estabilidade do processo devido à capacidade de trabalhar com altos tempos de retenção celular quando operados com baixos tempos de detenção hidráulica. Em vários desses reatores, a retenção do lodo resulta do crescimento da biomassa aderida a suportes ou devido ao processo de auto - imobilização resultado da formação do grânulo de lodo no suporte dentro do reator (ZAIAT et al., 1997).

Estes reatores são conhecidos por trabalharem sob operação contínua sem que ocorra o processo de arraste dos microorganismos com conseqüente perda da biomassa aderida aos suportes dentro do reator. Além dessa vantagem, este tipo de reator tem como característica o acréscimo do tempo disponível para a função catalítica desempenhada pelas células em uma reação ou séries de reações (FAN et al. 1989).

Com o objetivo de desenvolver novas configurações de reatores anaeróbios, ZAIAT et al. (1994) concebeu o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) utilizando espuma de poliuretano como matriz para a imobilização da biomassa. Experimentos utilizando água residuária de indústria de papel (FORESTI et al., 1995) e substrato a base de glicose (ZAIAT et al., 1997) confirmaram a viabilidade técnica do RAHLF, cujo desempenho apresentou-se satisfatório para diferentes condições de operação. Em ambos experimentos, o período de partida mostrou-se muito curto (menos de 10 dias), e as matrizes de poliuretano mostraram-se adequadas para a retenção e crescimento da biomassa.

VARESCHE et al. (1997) estudaram a composição morfológica da biomassa aderida às matrizes de poliuretano, oriundas de reator anaeróbio horizontal de leito fixo alimentado com substrato à base de glicose. Neste estudo, os autores concluíram que a aderência da biomassa é determinada principalmente pelas características do material de suporte, enquanto a formação do grânulo de lodo depende das características do efluente e do reator.

Informações a respeito das características fisiológicas, estrutura, composição biológica e relações inter e intra-específicas das células constituintes da biomassa vêm contribuindo para o esclarecimento dos mecanismos que regulam os processos anaeróbios (degradação de substratos, granulação do lodo, formação do biofilme).

O entendimento do processo de colonização de suportes, em sistemas com biomassa imobilizada, é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas configurações de reatores anaeróbios que sejam capazes de operar com altos tempos de retenção celular,

otimizando o processo de degradação da matéria orgânica. Essas novas configurações devem ainda minimizar os problemas relacionados com a operação do sistema, como entupimento, arraste de biomassa e partida lenta.

Nesse sentido, este trabalho tem o intuito de estudar a influência do substrato na colonização das matrizes de poliuretano, auxiliando na elucidação de alguns aspectos operacionais observados em reatores de leito fixo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo estudar a formação do biofilme anaeróbio aderido a matrizes de poliuretano, em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo diferenciais, para diferentes tipos de substratos: extrato de carne, glicose, amido, óleo de soja e esgoto doméstico sintético.

2.2 Objetivos Específicos

- estudar a formação e a caracterização morfológica do biofilme anaeróbio, em matrizes de poliuretano, através das análises de microscopia ótica e eletrônica de varredura;
- quantificar a biomassa retida nas espumas de poliuretano;
- quantificar o polímero extracelular produzido durante o processo de aderência;
- ajustar modelos que descrevam o processo de aderência em matrizes de poliuretano.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Substratos

3.1.1. Carboidratos

Também chamados de hidratos de carbono, glúcides, glicídios ou açúcares, são moléculas que possuem estruturas química de poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas, formados basicamente por átomos de hidrogênio, oxigênio e carbono. Os carboidratos são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados nas mais diversas formas (glicose, amido, celulose, fibras de madeira, sacarose, etc.). Todas as formas de carboidratos são freqüentemente encontradas em várias águas residuárias (METCALF & EDDY, 1991).

Açúcares contendo seis carbonos, chamados hexoses, são os mais importantes doadores de elétrons para a maioria dos microorganismos quimiorganotróficos, sendo a glicose o mais abundante deles. A degradação da glicose se dá por meio da reação de Embden-Meyerhof mais comumente chamada de glicólise. Esta reação se dá através da ação de bactérias fermentativas sacarolíticas (*Clostridium butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum*, *Bacteroides*) formando produtos como etanol, fomiato, lactato, acetato e CO₂, entre outros (MADIGAN et al., 2000).

O amido é constituído por moléculas de glicose unidas entre si através de ligações α 1,4-glicosídicas, sendo o principal meio de armazenamento de energia das plantas. O amido, na verdade, é formado por dois polímeros que diferem entre si pela estrutura da molécula. Em um desses polímeros, denominado amilose, a molécula não é ramificada, já no outro, denominado amilopectina, ocorre uma ramificação a cada 20 ou 30 unidades de glicose (MADIGAN et al., 2000).

O amido é degradado por várias bactérias (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* - BULL, 1991), sendo hidrolisado pela ação de uma enzima chamada amilase, a qual quebra o amido em moléculas de glicose.

3.1.2. Lipídios

Lipídios são gorduras naturais formadas pela reação de esterificação de ácidos graxos de cadeia longa e glicerol (MULDER & WALSTRA, 1974). Efluentes com grandes quantidades de lipídios são produzidos por indústrias de refino de óleo comestível e de processamento de lã, laticínios, matadouros, fábricas de margarina e frigoríficos. O tratamento anaeróbio desses efluentes apresenta vários problemas, sendo um dos mais comuns a flotação do lodo e seu subsequente arraste para fora dos reatores. Os lipídios impossibilitam também a formação de grânulos em reatores UASB, além de apresentarem degrabilidade reduzida devido a sua baixa biodisponibilidade (PETRUY & LETTINGA, 1995).

SAMSON et al. (1985) constataram que a absorção de lipídios à biomassa anaeróbia em reatores UASB causa a desintegração do grânulo ocasionando a falência do sistema. ANDERSEN & SCHMID (1985) utilizaram reatores anaeróbios no tratamento de efluentes oriundos de matadouros. Os pesquisadores observaram que o acúmulo de lipídios, na forma de espuma no topo dos reatores, causou o entupimento das linhas de saída de gases e de efluentes.

Em ambientes anaeróbios, os lipídios são primeiramente hidrolisados pelas bactérias fermentativas, através da ação de enzimas extracelulares chamadas lipases, acarretando na liberação de ácidos graxos, glicerol e galactose entre outros produtos. As lipases não são muito específicas, devido a este fato, elas atacam ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia. Já os fosfolipídios são hidrolisados por enzimas específicas chamadas fosfolipases. A denominação das fosfolipases varia de acordo com a ligação do éster a ser clivada. As fosfolipases A e B atacam os ésteres da mesma maneira que as lipases, quebrando as ligações entre os ácidos graxos e o glicerol (Figura 3.1a). As fosfolipases C e D por sua vez, clivam as ligações existentes entre os radicais fosfato e os ésteres (Figura 3.1b). Como resultado da ação dessas enzimas, ácidos graxos e glicerol são liberados, sendo que substâncias podem ser, em seguida, degradadas anaerobiamente por vários microorganismos quimiorganotróficos.

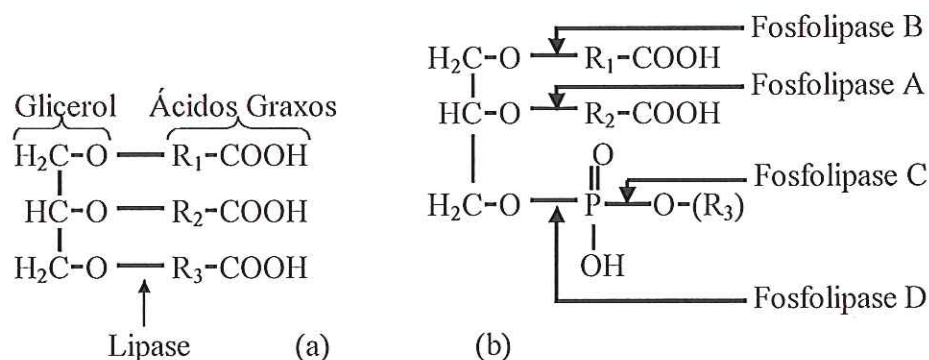


Figura 3.1: Ação da lipase na hidrólise de lipídios (a); Ação das fosfolipases na hidrólise de fosfolipídios (b).

Nos digestores anaeróbios, onde o tempo de retenção do material a ser degradado é longo, os ácidos graxos de cadeia curta e longa são β -oxidados a acetato pelas bactérias produtoras de H_2 (MCINERNEY et al., 1979; MCINERNEY & BRYANT., 1981). A reação de β -oxidação consiste na quebra da cadeia que forma os ácidos graxos, tendo como produto uma molécula de acetil-CoA, que por sua vez pode ser oxidada no ciclo do ácido cítrico ou convertida a hexoses e outros constituintes celulares (MADIGAN et al., 2000).

As bactérias da espécie *Anaerovibrio lipolytica* são bacilos curvos gram-negativos que fermentam glicerol, ribose e frutose transformando-os em acetato, propionato e succinato. Estas bactérias também são capazes de hidrolisar os triglicéridos e fosfolipídios a ácidos graxos e glicerol (MCINERNEY, 1988). Galactolipídios, fosfolipídios e sulfolipídios são degradados pelas bactérias *Butirovibrio S2* que utilizam os ácidos graxos de cadeia longa liberados pela hidrólise na confecção de sua membrana lipoprotéica (HAZLEWOOD & DAWSON, 1979). Alguns espiroquetas, pertencentes aos gêneros *Borrelia* e *Treponema*, também são lipolíticas, utilizando os ácidos graxos formados como fonte de carbono e energia para o seu crescimento (TREVATHEN et al., 1982).

3.1.3. Proteínas

Proteínas são macromoléculas formadas pela união de L - α - aminoácidos através de ligações peptídicas. Elas estão presentes em todos os seres vivos onde desempenham diferentes e importantíssimas funções (LEHNINGER et al., 1993).

A estrutura das proteínas é formada por unidades fundamentais, os L - α - aminoácidos, os quais possuem uma mesma estrutura básica, formada por um átomo central de carbono conectado por ligações covalentes a quatro diferentes átomos ou grupos. Eles possuem três radicais iguais, sendo um átomo de hidrogênio (-H), um grupo carboxílico (-COOH), um grupo amina (-NH₂). Os L - α - aminoácidos são diferenciados entre si através dos 20 tipos de radicais (-R) conectados ao carbono central.¹(NORTH apud TOMMASO, 1999).

As seqüências de L - α - aminoácidos formam as cadeias polipeptídicas, sendo que as proteínas são constituídas por uma ou mais dessas cadeias. No caso de proteínas formadas por mais de uma cadeia polipeptídica, estas cadeias podem tanto ser iguais ou diferentes entre si. As proteínas que possuem cadeias iguais são chamadas de proteínas oligoméricas, sendo suas cadeias denominadas protômeros (LEHNINGER et al., 1993).

A degradação de proteínas é um processo complexo envolvendo um grande número de diferentes espécies de microorganismos anaeróbios. A variedade de espécies envolvida nessas reações reflete a variedade de rotas metabólicas envolvidas. Em geral, as proteínas são hidrolisadas a peptídeos e aminoácidos os quais são fermentados a ácidos voláteis, CO₂, H₂, NH₄⁺, e S²⁻ por bactérias fermentativas como as do gênero *Clostridium* (MCINERNEY, 1988).

Digestores anaeróbios contêm um grande número de bactérias proteolíticas, por volta de 6,5 x 10⁷ bactérias por mililitro. A maioria das bactérias isolada de biomassa proveniente de digestores pertence ao gênero *Clostridium*, embora *Peptococcus anaerobicus*, *Bifidobacterium sp.*, *Staphylococcus* e algumas espécies de bacilos (gram negativas), também proteolíticas, tenham sido encontradas. A maioria dos estudos mostra que as principais bactérias proteolíticas presentes em digestores são gram positivas, principalmente as do gênero *Clostridium* (MCINERNEY et al., 1988). Segundo MCINERNEY (1988) ambos os gêneros *Clostridium sp.* e *Eubacterium* são microorganismos proteolíticos presentes em digestores empregados no tratamento de soro de leite.

JAIN & ZEIKUS (1985) isolaram uma bactéria proteolítica, *Clostridium proteolyticum*, a partir do lodo de reator tratando esgoto doméstico. Os autores constataram que esta espécie era capaz de hidrolisar várias proteínas e de fermentar os aminoácidos, obtendo como produtos acetato, CO₂, e pequenas quantidades de H₂, isovalerato e isobutirato.

¹ NORTH, A. C. T. & ATWOOD, T. K. (1991) *Protein structure*. Burlington: Cbr, 31p.

A transferência de moléculas de hidrogênio interespecies é importante na degradação de certos aminoácidos como no caso das reações de desaminação ou descarboxilação oxidativas, onde ocorre a produção de hidrogênio a partir dos aminoácidos reduzidos. Em casos como os da oxidação da alanina e da leucina é necessário manter-se a pressão parcial de hidrogênio em níveis muito baixos para que estas reações sejam energeticamente favoráveis, condição atingida através do consumo do hidrogênio pelos microorganismos hidrogenotróficos presentes no consórcio microbiano (MCINERNEY, 1988).

Após a etapa de hidrólise, os aminoácidos são rapidamente fermentados, por bactérias acidogênicas fermentativas, originando ácidos voláteis de cadeia curta, nitrogênio amoniacal e dióxido de carbono. A degradação anaeróbia de aminoácidos envolve reações de oxi-redução entre um ou mais aminoácidos, ou mesmo entre tais compostos e moléculas não nitrogenadas derivadas dos próprios aminoácidos. Desaminações, transaminações e α -ceto oxidações são as reações mais freqüentes nas fermentações de aminoácidos (MCINERNEY, 1988).

Muitos microrganismos podem obter energia por meio de reações de oxi-redução envolvendo pares de aminoácidos. Estas são chamadas reações de Stickland, onde um aminoácido é oxidado enquanto o outro é reduzido. A alanina ($\text{CH}_3\text{CHNH}_2\text{COOH}$), quando oxidada na presença da glicina ($\text{CH}_2\text{NH}_2\text{COOH}$), segue este modelo, sendo originado ácido acético como produto dessa reação, como:



Nestas reações, alguns aminoácidos são doadores de elétrons, incluindo a alanina, leucina, isoleucina, valina e histina. O grupo de aminoácidos aceptores de elétrons é formado pela glicina, prolina, hidroxiprolina, ornitina, arginina e triptofano, entre outros. Nem todos estes aminoácidos são usados pelas mesmas espécies e além disso, as velocidades de utilização de diferentes aminoácidos por uma mesma espécie diferem entre si (MCINERNEY, 1988).

3.1.4. Esgoto sanitário

O esgoto sanitário ou doméstico é formado de constituintes físicos, químicos e biológicos, sendo uma mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas, suspensas e dissolvidas na água. Em grande parte, a matéria orgânica presente no esgoto é constituída

por resíduos alimentícios, excreta, material vegetal, sais minerais, orgânicos e outros compostos como detergentes e sabões (TORRES 1992).

De acordo com TEBBUT (1977), a fração sólida presente no esgoto sanitário representa apenas 0,1 % do seu total em massa, sendo formada por cerca de 70% de matéria orgânica. METCALF & EDDY (1991) afirmam que 75 % dos sólidos suspensos e 40 % dos sólidos filtráveis presentes no esgoto doméstico são constituídos por matéria orgânica. Segundo os autores, geralmente, essa fração orgânica tem sua constituição distribuída da seguinte maneira: 40 a 60 % por proteínas; 25 a 50 % por carboidratos; 10 % por lipídios.

Segundo KASPAR e WHURMANN (1978), a degradação anaeróbia de materiais orgânicos particulados, formados principalmente por proteínas, carboidratos e lipídios, se dá numa primeira etapa através da hidrólise de tais constituintes. A etapa de hidrólise produz açúcares e aminoácidos, no caso de carboidratos e proteínas. Já na hidrólise de lipídios, há a liberação de ácidos graxos, glicerol e galactose entre outros produtos. Na etapa seguinte, os aminoácidos e açúcares são então fermentados, liberando acetato, etanol, propionato, hidrogênio, dióxido de carbono e outros compostos. Os ácidos graxos são oxidados a acetato, hidrogênio e dióxido de carbono os quais são utilizados como substrato na fase metanogênica da digestão anaeróbia.

3.2. Biofilme

Segundo COSTERTON et al. (1995), biofilmes são populações microbianas, presas a matrizes de polissacarídeos, onde os microorganismos podem se aderir uns aos outros e/ou superfícies ou interfaces. De acordo com esta definição, tanto consórcios microbianos na forma de grânulos encontrados em reatores anaeróbios (UASB, compartimentado), flocos ou agregados presentes nos sistemas de lodos ativados e biomassa aderida a suportes podem ser considerados como sendo biofilmes.

Biofilmes, na forma de biomassa aderida a suportes, vêm sendo utilizados em reatores biológicos para o tratamento águas residuárias. Reatores com biofilme fixo permitem que o processo anaeróbio obtenha bom desempenho com grande estabilidade, já que estes reatores são os que propiciam maiores razões entre o tempo de retenção celular e o tempo de residência hidráulico - θ_c / θ_h (SPEECE, 1996).

COSTERTON et al. (1997), utilizando técnicas de microscopia confocal a laser de varredura, examinaram culturas puras em laboratório e biofilmes retirados de ambientes naturais que possuíam grande diversidade de espécies. Eles constaram que a maioria dos

biofilmes é composta de microcolônias de células envolvidas em matrizes polímeros extracelulares (PEC) entremeadas por canais ("water channels"). Estes canais são formados pelas forças de cisalhamento exercidas pelos fluidos que atravessam o biofilme.

A estrutura de canais / microcolônias do biofilme sugere a possibilidade de uma grande heterogeneticidade dentro dessas comunidades microbianas, compostas por microorganismos de diferentes espécies, morfologias e propriedades fisiológicas e metabólicas (LEWANDOWSKI et al., 1998). Claramente, o acesso dos nutrientes e a remoção de produtos de excreção também dependem da posição de cada célula dentro do biofilme, e esta heterogeneticidade estrutural promove a formação de micronichos dentro dos quais células de diferentes características fisiológicas podem viver em harmonia (WOLFAARDT et al., 1994; COSTERTON et al., 1994).

Segundo COSTERTON et al. (1978), a cooperação metabólica (co-metabolismo) entre as espécies do consórcio microbiano é predominante todos sistemas biológicos. Devido ao alto nível de organização, os microorganismos dentro do biofilme se beneficiam da justaposição e da cooperatividade fisiológica entre eles, por conseguinte, microorganismos constituintes da comunidade funcional coordenada são muito mais eficientes que populações mistas de organismos plantônicos.

COSTERTON et al. (1995), depois de uma grande série de análises quantitativas de biofilmes em vários ambientes, construíram uma base de dados que lhes permitiu prever a formação de biofilmes em sistemas aquáticos, baseado nos seguintes princípios:

1. Os microorganismos apresentam notável avidez por aderirem a superfícies, e esta tendência é especialmente pronunciada em células presentes em ambientes naturais;
2. O grau de agregação do biofilme a superfícies em qualquer sistema aquático é controlado pela quantidade de nutrientes disponíveis para a reprodução das células e para produção de polissacarídeos extracelulares;
3. Em ambientes extremamente oligotróficos, nutrientes orgânicos tendem a se associar às superfícies disponíveis, iniciando o desenvolvimento do biofilme, no entanto, os microorganismos geralmente não se aderem a superfícies em ecossistemas onde haja grande deficiência de nutrientes.

Usando estes princípios, pode-se prever se o biofilme irá se desenvolver em um determinado sistema. Além disso, pode-se verificar a acuidade dessas previsões através de observações diretas dos sistemas estudados, dentro dos quais outros fatores locais podem ser igualmente importantes.

Biofilmes microbianos são caracterizados em parte pela produção de uma extensa rede de exopolissacarídeos altamente hidratados. A produção de polímeros extracelulares (PEC) pelos microorganismos constituintes do biofilme apresenta muitas funções, incluindo a aderência inicial dos microorganismos a superfícies, formação e manutenção da microcolônia e da estrutura do biofilme, aumento da resistência do biofilme a agentes antimicrobianos e a condições ambientais desfavoráveis, proteção do biofilme contra a ação predatória de protozoários, e serve também como reserva de substrato para o próprio biofilme. O PEC excretado pelo biofilme apresenta alta heterogeneidade espacial em relação à sua composição química e suas propriedades físicas (COSTERTON et al., 1995).

3.2.1. Filme condicionante

As propriedades físicas e químicas do filme estagnado próximo à interface sólido-líquido diferem sensivelmente das propriedades no seio do líquido, sendo que isto ocorre de acordo com o equilíbrio termodinâmico estabelecido entre estas duas regiões. Devido a este fenômeno, certos substratos e nutrientes tendem a se acumular na superfície, formando um gradiente de concentração entre o seio do líquido e a superfície do sólido. A este acúmulo de substâncias na superfície do sólido é dado o nome de Filme Condicionante, o qual, segundo vários estudos, exerce influência positiva nas atividades dos microorganismos (COSTERTON et al., 1995).

A natureza e a quantidade de moléculas adsorvidas e a distribuição destas na superfície são diretamente proporcionais às propriedades da superfície em questão e às substâncias presentes na fase aquosa. A adsorção molecular em ambientes naturais pode ocorrer de duas maneiras, muitas vezes simultaneamente - adsorção física, devido às forças de Van der Waals, e adsorção química ocasionada por ligações químicas (iônicas, covalentes), pontes de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, e interações eletrostáticas. (MARSHALL, 1996).

No processo de aderência inicial, quando o substrato é adsorvido na superfície de suportes inertes, este se difunde através do filme estagnado até a célula microbiana. A velocidade de transporte de substrato para as células ativas é determinada pelo gradiente de concentração do mesmo, o qual se torna acentuado se o microorganismo se aproxima da superfície enriquecida com substrato. Assim sendo, há uma tendência dos microorganismos se aderirem a suportes, devido ao substrato adsorvido (van LOOSDRECHT et al., 1990).

3.2.2. Colonização de Suportes Inertes por Microorganismos

A superfície de materiais inertes é o local utilizado preferencialmente pelos microorganismos no desenvolvimento de suas atividades metabólicas. Este fato foi comprovado em diversos estudos, os quais observaram que numa população de microorganismos, os microorganismos aderidos apresentaram maior atividade metabólica do que os que permanecem em suspensão (van LOOSDRECHT et al., 1987). Outra característica importante, é que a aderência dos microorganismos é frequentemente maior durante a fase de crescimento exponencial, presumidamente como resultado do aumento da hidrofobicidade da parede celular durante nesta fase.

3.2.3. Fases da Colonização de Suportes

Segundo van LOOSDRECHT et al. (1990), a colonização por microorganismo de interfaces sólido-líquidas pode ocorrer na seqüência descrita na Figura 3.2.

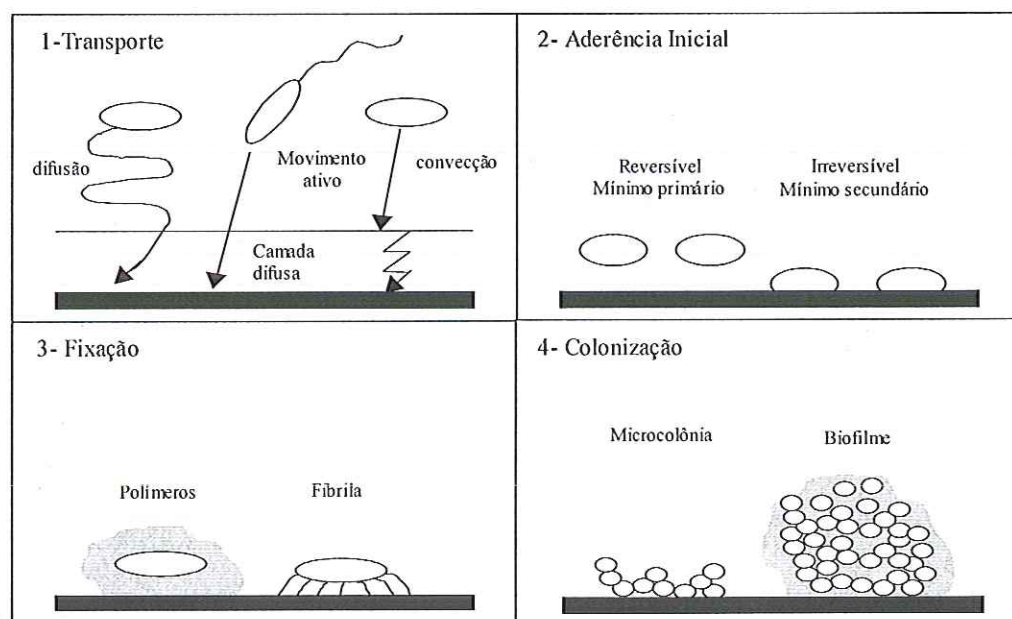


Figura 3.2: Seqüência das etapas de colonização de superfícies por microorganismos (van LOOSDRECHT et al. 1990).

De acordo com o diagrama apresentado na Figura 3.2, num primeiro momento, os microorganismos podem se aproximar da superfície do suporte de três diferentes maneiras:

(i) Transporte Difusivo: Os microorganismos, quando em suspensão, possuem movimento Browniano devido aos choques entre eles que os possibilita ultrapassar a camada

difusiva (camada limite ou filme estagnado) junto à superfície. O transporte difusivo é pequeno se comparado ao convectivo ou ao devido à mobilidade dos microorganismos.

(ii) Transporte Convectivo: Este tipo de transporte de células se dá através do movimento do líquido que circunda os microorganismos e pode ser várias ordens de magnitude maior que o transporte difusivo, no entanto, em regiões próximas à superfície (camada difusiva) a difusão controla o processo.

(iii) Movimento Ativo: Uma vez que o microorganismo esteja nas proximidades de uma superfície, ele pode se dirigir aleatoriamente até ela, ou então, ele pode se aproximar da superfície respondendo quimicamente ao gradiente de concentração de nutrientes que podem existir na região de interface.

A próxima etapa é a aderência inicial, a qual é preponderantemente um processo físico-químico, que pode ser reversível ou irreversível. A diferença não é muito clara, assim, para facilitar a compreensão do fenômeno, define-se a aderência reversível como sendo a deposição de microorganismos sob uma superfície onde estes ainda apresentem movimento Browniano e possam ser prontamente removidos por tensões de cisalhamento fracas ou pela mobilidade dos próprios microorganismos. Já na aderência irreversível, os microorganismos não apresentam movimento Browniano e não podem ser removidos ao menos que fortes tensões de cisalhamento estejam presentes.

Logo após a aderência inicial vem a etapa de fixação à superfície. Depois que o microorganismo está aderido à superfície, estruturas especiais da membrana celular (fibrilas e/ou polímeros) formam fortes ligações entre a membrana e a superfície do sólido fixando o microorganismo.

A última etapa é a colonização da superfície. Uma vez fixadas, as células começam a se multiplicar, promovendo o crescimento da biomassa, onde as novas células permanecem aderidas umas às outras, formando o biofilme.

3.2.4. Aderência Inicial

Os microorganismos em suspensão se comportam aproximadamente como um sistema coloidal e, a partir desta hipótese, a etapa inicial de aderência pode ser descrita pela teoria química dos colóides, também chamada de teorias DLVO. Estas teorias descrevem as mudanças na energia livre de Gibbs como sendo função da distância entre dois corpos. Na ausência de efeitos estéricos, a energia livre de Gibbs pode ser obtida pela somatória das interações eletrostáticas e de Van der Waals.

As forças de Van der Waals são geralmente atrativas. Por sua vez, as forças eletrostáticas são normalmente repulsivas devido ao fato de que a natureza de ambas superfícies, célula e sólido, são predominantemente carregadas negativamente.

A Figura 3.3 mostra as interações eletrostáticas (G_e), de Van der Waals (G_A) e referentes à energia livre de Gibbs (G_{tot}) como sendo função da distância (H) entre a superfície da partícula e da interface sólido-líquido, para diferentes condições de força iônica. Numa condição de força iônica baixa (pequena interação entre os íons em suspensão – $C_z = 0.01$ M), G_{tot} possui um máximo positivo que constitui uma barreira energética à aderência junto à superfície do sólido (mínimo primário ou irreversível). Para valores intermediários de força iônica ($C_z = 0.1$ M), o máximo atingido pela energia livre de Gibbs (G_{tot}) apresenta valores bem menores, possibilitando que algumas partículas, que contenham energia térmica suficiente para ultrapassar a barreira de repulsão, possam aderir irreversivelmente ao suporte. Finalmente, em condições de força iônica alta ($C_z = 1$ M), G_{tot} assume valores negativos para qualquer distância entre as superfícies, favorecendo a aderência irreversível.

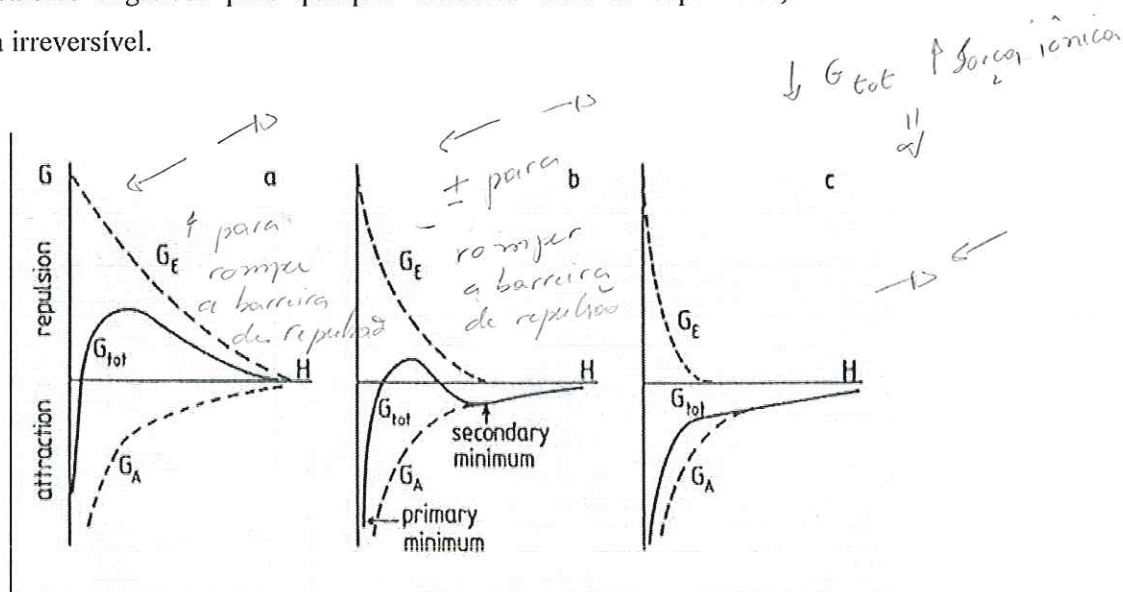


Figura 3.3: Gráficos de Energia Livre de Gibbs em função da distância entre a bactéria e a superfície plana. Representação esquemática para (a) baixos, (b) intermediários, e (c) altos valores de força iônica (van LOOSDRECHT et al., 1990).

De acordo com a Figura 3.3, os valores de G_{tot} decrescem com o aumento da força iônica. Isto se dá devido à redução da repulsão entre as superfícies, evidenciado pelo decréscimo nos valores referentes às interações eletrostáticas (G_e). Para grandes distâncias de separação (poucos nanômetros), um mínimo secundário aparece, sendo mais pronunciado

em sistemas onde a força iônica seja intermediária e onde existam fortes interações de Van der Waals geradas pela presença de grandes partículas.

Os microorganismos estão inseridos neste contexto, já que a maioria deles vive em condições de força iônica intermediária e possuem comportamento semelhante ao de grandes partículas. Segundo estas hipóteses, a aderência inicial dos microorganismos é um processo primeiramente reversível ocorrendo em um mínimo secundário de energia segundo as teorias DLVO.

A pequenas distâncias ($H < 1\text{nm}$), interações como pontes de hidrogênio e ligações iônicas ao lado dos efeitos estéricos são os responsáveis pelo processo de aderência, determinando a intensidade da interação (força) da aderência junto à superfície (mínimo primário). Efeitos estéricos ou ligações poliméricas podem ocorrer na presença de moléculas poliméricas na superfície da célula, ou do suporte, ou de ambos (Figura 3.4). Estes efeitos influenciam o fenômeno de aderência e não são levados em conta pelas teorias DLVO.

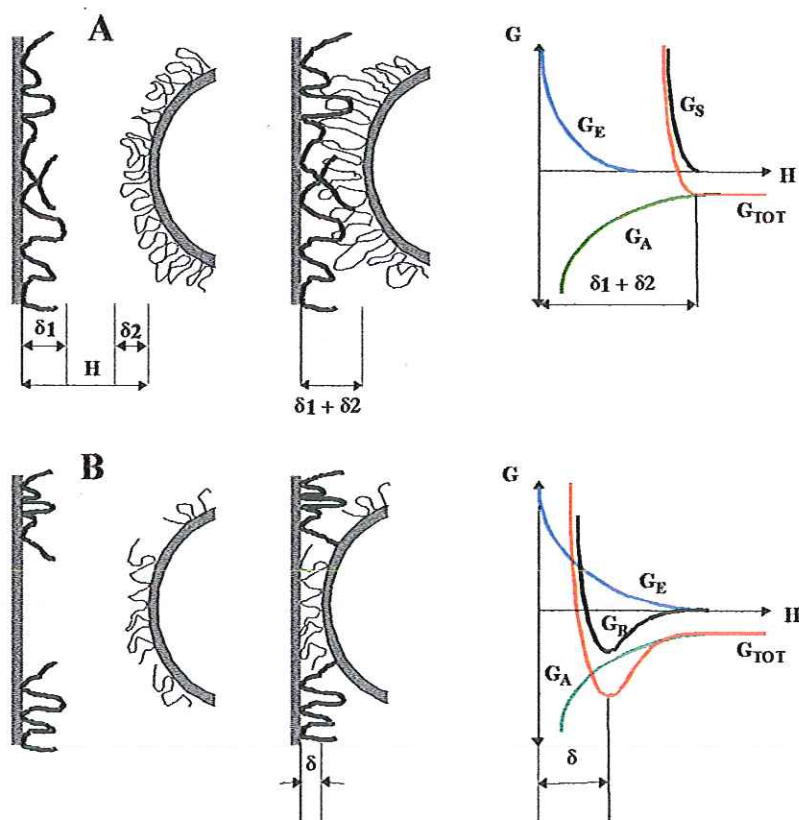


Figura 3.4: (A) Interação repulsiva entre superfícies cobertas por polímeros – efeito estérico; (B) fixação através ligações entre duas superfícies carregadas negativamente; G_A interações de Van der Waals; G_E interações eletrostáticas; G_S interações estéricas; G_B interações devido às ligações poliméricas; G_{TOT} energia livre de Gibbs; H distância entre as duas superfícies; δ espessura média da camada de recobrimento polimérico.

Os polímeros extracelulares (PEC), compostos por polissacarídeos e polipeptídios, são excretados pelos microorganismos contribuindo para a aderência entre diferentes espécies sintróficas de arqueas metanogênicas e bactérias acetogênicas presentes nos grânulos provenientes de reatores anaeróbios, aumentando a estabilidade desses grânulos (ALIBHAI e FOSTER, 1986).

Em sistemas biológicos de tratamento de efluentes, os microorganismos tendem a se agregar formando flocos, grânulos e filmes sobre materiais inertes. Este processo permite que os reatores retenham mais biomassa reduzindo a tendência de arraste desses microorganismos para fora do sistema. No entanto, os mecanismos envolvidos no processo de biofloculação em sistemas de lodos ativados não são completamente conhecidos, embora se acredita que os PEC sejam fundamentais na formação dos flocos (JIA et al., 1996).

ROSS (1984) sugere que os mecanismos de biofloculação propostos para sistemas de tratamento aeróbios também possam ser aplicados para a formação de biofilmes anaeróbios, todavia, pesquisas sobre a produção de PEC pela biomassa anaeróbia ainda são muito limitadas.

HARADA et al. (1988) examinaram o tamanho médio e a resistência mecânica de grânulos retirados de dois reatores UASB tratando carboidratos e ácidos graxos de cadeia curta respectivamente. Eles constataram que os grânulos provenientes do reator alimentado com carboidratos apresentavam maior tamanho e resistência mecânica. Esta diferença foi atribuída à maior produção de PEC por parte da biomassa alimentada com carboidratos.

De BEER et al. (1996) estudaram a biomassa proveniente de reator UASB e atribuíram a baixa susceptibilidade de flotação dos grânulos à presença de PEC hidrofílicos que evitavam a aderência de bolhas de gás.

SAM-SOON et al. (1991), por outro lado, especularam que altas pressões parciais de hidrogênio induziriam as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas a produzir PEC promovendo a granulação. MORGAN et al. (1990) demonstraram que as concentrações de PEC, tanto quanto as cargas elétricas na superfície da célula, afetavam a estabilidade estrutural dos grânulos anaeróbios.

Os grânulos apresentam estrutura constituída de 1 a 4% de PEC do total de sólidos presentes, sendo que a quantidade de PEC produzida é dependente do tipo de microorganismo presente nos grânulos. As bactérias acidogênicas reconhecidamente produzem mais PEC que as arqueas metanogênicas e, devido a este fato, a distribuição das populações de microorganismos nos grânulos afetam diretamente a quantidade de PEC produzido (QUARMBY et al., 1995).

VEIGA et al. (1997) estudaram grânulos retirados de reatores UASB alimentados com uma mistura de ácidos voláteis, onde duas espécies prevaleciam, *methanobacterium formicicum* e *methanosarcina mazei*. Os polissacarídeos extracelulares constituíam aproximadamente de 14 a 20% de todo polímero extracelular excretado pelas células. Os resultados indicaram que as duas espécies metanogênicas, especialmente a *methanobacterium formicicum*, contribuem significativamente para a produção de polímeros extracelulares em grânulos anaeróbios.

JIA et al. (1996) investigaram mudança na distribuição de cargas na superfície das células e sua relação com a produção de polímeros extracelulares (PEC). Eles utilizaram três reatores operando em regime de batelada alimentados com propionato, butirato e glicose, respectivamente. Eles constataram que a mudança nas cargas, tornando-as mais negativas, para os dois primeiros reatores foi principalmente devido ao aumento das frações de polipeptídios presentes nos polímeros excretados. O reator alimentado com glicose também apresentou aumento das cargas negativas, no entanto, este aumento foi atribuído à elevação das quantidades de polissacarídeos e polipeptídios presentes no biofilme.

ZHANG et al. (1999) estudaram cinco métodos comumente empregados na extração de polímeros extracelulares (PEC) – centrifugação regular; extração com ácido etileno-diaminatetraacético (EDTA); ultracentrifugação; extração a vapor; e centrifugação regular com formaldeído (CRF). Este estudo teve como objetivo avaliar as eficiências e a reprodutibilidade dos métodos selecionados na extração de polímeros de biofilmes compostos de microorganismos aeróbios, redutores de sulfato, nitrificantes e desnitrificantes. As eficiências foram medidas através das concentrações finais de proteína e polissacarídeos. Ao final, o método CRF mostrou-se mais eficiente na extração de polímeros na forma de polissacarídeos e o de extração a vapor na de polímeros na forma de polipeptídios (proteínas). As concentrações de DNA no PEC foram em média 27 vezes menores que nos pellets, para todos os métodos empregados, indicando que não houve significativa lise das células durante os processos de extração.

O processo de aderência de microorganismos a superfícies inertes e a outros microorganismos pode se dar através de emaranhados de fibras de polissacarídeos ou feixes de moléculas de açúcar. Estas fibras formam o glicocálix que pode envolver uma célula individual ou uma colônia de células estendendo-se desde a superfície do microorganismo até a interface do sólido ou de uma outra célula (COSTERTON et al., 1978).

O glicocálix é formado a partir da superfície da membrana do microorganismo (Figura 3.5), a qual é composta de uma bicamada de moléculas de lipídios onde moléculas de proteínas estão inseridas. Estruturas formadas por lipopolissacarídeos recobrem a membrana,

e a estas estruturas estão fixadas enzimas chamadas polimerases, que são responsáveis pela síntese das fibras que formam o glicocálix. Nesta configuração, as fibras formam canais por onde vários nutrientes, os quais estão localizados próximos à superfície do material inerte, difundem-se na direção das células, atravessando a membrana por meio de cadeias de proteínas (COSTERTON et al., 1978).

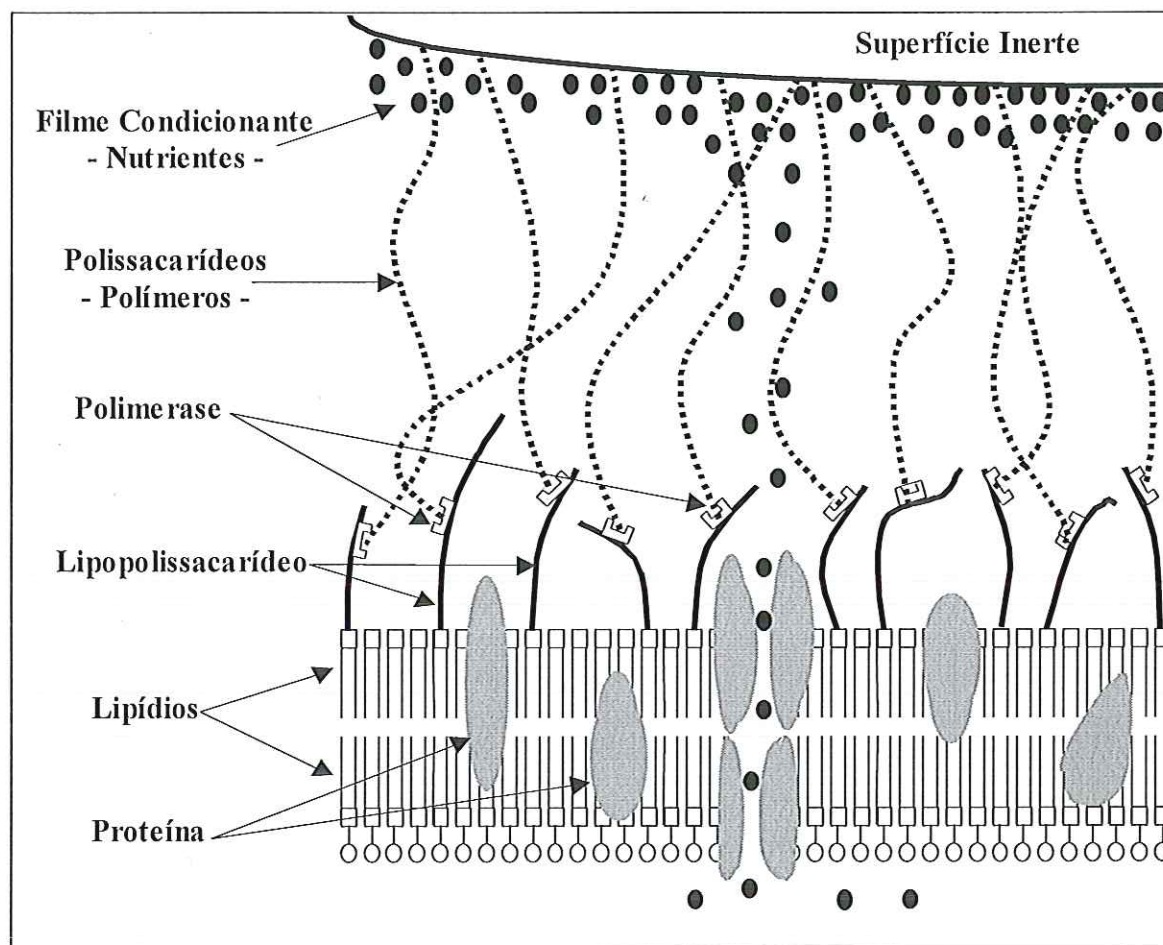


Figura 3.5: Processo de aderência de microorganismos através de fixação e secreção de polímeros (COSTERTON et al., 1978).

A natureza química do glicocálix varia em relação à composição das fibras, diferindo de célula para célula e de acordo com o estágio de vida em que as células se encontram.

3.3. Ecologia Microbiana

3.3.1. Domínio Bactéria

Bactérias constituem um grupo de microorganismos de ocorrência nos mais diversos habitats. Apresentam enorme diversidade de vias metabólicas, reunindo organismos especializados na utilização de compostos orgânicos (heterotróficos e organotróficos) ou inorgânicos como fonte de energia (quimiorganotróficos e litotróficos), e aqueles capazes de utilizar luz como fonte de energia no metabolismo (fototróficos) (CANHOS & VAZOLLER, 1999).

Segundo HUGENHOLTZ et al. (1998)) apud CANHOS & VAZOLLER (1999), o Domínio Bactéria compreende pelo menos 36 divisões, incluindo 12 divisões descritas por WOESE (1987), baseadas principalmente na seqüência de rRNA 16S de organismos cultivados, além de 12 novas divisões putativas, descritas em estudo recente envolvendo a análise de seqüências de rDNA 16S isoladas diretamente do meio ambiente e 12 linhas de descendência descritas em outros estudos (MAIDAK et al., 1997).

3.3.2. Diversidade Bacteriana

A Figura 3.6 mostra as divisões alocadas no Domínio Bactéria, de acordo com a classificação filogenética construída com base na comparação de seqüências do rRNA 16S (MANDIGAN et al., 1997), apresentando o estado da arte em 1987, em contraste com a classificação recente compilada por ²HUGGENHOLTZ et al. (1998) apud CANHOS & VAZOLLER (1999).

²Hugenholtz, P.; Goebel, B.M.; Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, v. 180, p. 4765-4774.

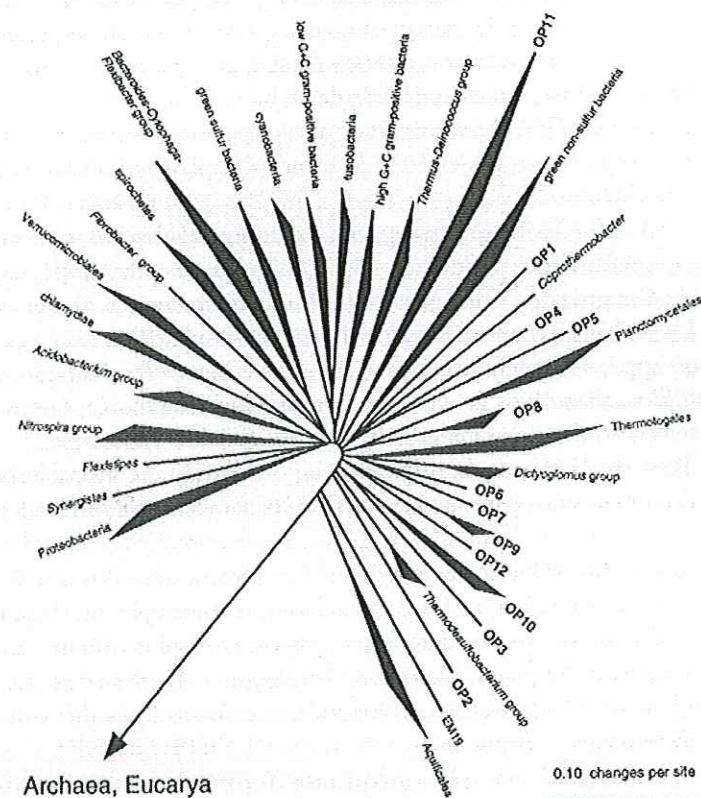


Figura 3.6: Representação radial dos grupos filogenéticos de Bactéria conhecidos em 1987 (figura menor baseada em WOESE, 1987) e em 1997 (baseado em HUGENHOLTZ et al., 1998a). Os setores em cunha indicam a ocorrência de duas ou mais seqüências representativas naquele nível de radiação.

De acordo com CANHOS & VAZOLLER. (1999), algumas das principais divisões do domínio Bactéria, segundo compilação de vários autores (WOESE, 1987; LOGAN, 1994; MADIGAN et al., 1997; HUGENHOLTZ et al., 1988a; TORTORA et al., 1988a, b), são descritas a seguir :

Aquifales: Organismos geralmente associados a ambientes geotermiais, sendo que os organismos isolados são termófilos e quimiotróficos, metabolizando hidrogênio.

Thermotogales: Compreendem os bacilos hipertermófilos anaeróbios, cuja temperatura ótima de crescimento é 80°C.

Thermus/Deinococcus: Organismos Gram-positivos, porém filogeneticamente distantes do grupo de bactérias Gram-positivas, sendo encontrados no solo e no ar.

Espiroquetas: na sua maioria, são organismos de vida livre, encontrados em ambientes aquáticos, com metabolismo anaeróbico e aeróbico facultativo. O formato das células é típico, revelando uma estrutura delgada, flexível e helicoidal. São classificadas em 6 gêneros de acordo com seu habitat, patogenicidade e características morfo-fisiológicas, a saber: *Borrelia*, *Cristispira*, *Leponema*, *Leptospira*, *Spirochaeta* e *Treponema*.

Bactérias verdes sulfurosas (green sulfur bacteria): A morfologia dessas bactérias é bastante diversa, incluindo bacilos sem mobilidade, espirilos e cocos. São encontrados em sistemas aquáticos e locais que contêm enxofre elementar, como águas termais ou sedimentos de lagos e rios. São organismos estritamente anaeróbios e fototróficos obrigatórios. Os compostos reduzidos de enxofre sustentam o metabolismo energético nos organismos das espécies do gênero *Chlorobium* e *Pelodictyon*.

Cytophagales: Grupo fisiologicamente diverso, incluindo bactérias anaeróbias estritas do gênero *Bacteroides*, aeróbias estritas do gênero *Sporocytophaga*, e grande variedade de bacilos com movimento deslizante, como as espécies do gênero *Cytophaga*. Compreende organismos quimiorganotróficos, encontrados na água e no solo, sendo algumas espécies celulolíticas. Organismos do gênero *Flavobacterium* são bastante conhecidos pela atividade de deterioração dos alimentos.

Planctomycetes: São bactérias aeróbias, encontradas em ambientes aquáticos, alocadas nos gêneros *Pirella* e *Planctomyces*.

Chlamydia: São bactérias parasitas obrigatórias, patógenos de animais e humanos, alocados em três espécies: *Chlamydia pneumoniae*, *C. psittaci* e *C. trachomatis*.

Bactérias Gram-positivas com Baixo Teor de G+C: São separadas em dois grandes grupos, filogeneticamente distintos, discriminados de acordo com o seu teor de guanina e citosina (G+C) no DNA.

Os organismos com baixo teor de G+C são bastante heterogêneos e compreendendo os bacilos, cocos e organismos pleomórficos com reação à coloração de Gram-positiva, com exceção das espécies de *Mycoplasma*, organismos que não apresentam parede celular. Congrega organismos do gênero *Clostridium*, as bactérias formadoras do ácido láctico (*Lactobacillus spp.* e *Lactococcus spp.*) e vários cocos (*Ruminococcus spp.*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Sarcina spp.* e *Staphylococcus spp.*). O metabolismo inclui homo- e hetero-fermentação e respiração, sendo alguns organismos micro-aerófilos, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos. Os Gram-positivos formadores de esporos podem ser exemplificados pelos gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Sporosarcina*.

Bactérias Gram-positivas com alto Teor de G+C ou Actinobacteria: A divisão Actinobacteria (Stachebrandt et al., 1997) compreende o grupo dos organismos com alto teor de G+C da família Actinomycetales e gêneros relacionados.

Em geral, são aeróbios, não são móteis na fase vegetativa e apresentam pleomorfismo em alguma fase do desenvolvimento celular, podendo formar filamentos. Os Actinomicetos incluem ainda organismos microaerófilos/anaeróbios obrigatórios formadores de ácido propiônico, alocados nos gêneros *Actinomyces*, *Bifidobacterium* e *Butyrivibrio*.

Cyanobacteria (blue green algae): São organismos fototróficos oxigênicos compreendendo várias espécies formadoras de filamentos. Podem ser encontradas em ambientes aquáticos e algumas espécies são fixadoras de nitrogênio.

Proteobacteria (bactérias púrpuras): Constituem o maior e mais diverso grupo de bactérias cultivadas, alocadas em 5 subdivisões: alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ) e epsilon (ϵ). Apresentam coloração Gram-negativa e uma enorme diversidade de morfologias e metabolismos, mesmo dentro de uma mesma radiação filogenética.

O grupo alfa compreende a maioria das bactérias púrpuras não-sulfurosas e dos organismos não-fotossintéticos com metabolismo diverso. Destacam-se os grupos nitrificantes (*Nitrobacter spp.*) e desnitrificantes (*Rhodopseudomonas spp.*).

No grupo beta estão alocadas as espécies de *Rhodocyclus*, *Spirillum*, *Thiobacillus* e *Zymomonas*, entre outros 12 gêneros definidos.

O grupo gama compreende os gêneros *Chromatium*, *Escherichia* e outras bactérias entéricas, além de *Legionella*, *Vibrio* e outros 9 gêneros.

O grupo delta reúne os gêneros *Bdellovibrio*, *Myxococcus* e bactérias redutoras do íon sulfato (*sulphate-reducing bacteria*).

No grupo epsilon estão alocados os gêneros *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Thiovulum* e *Wolinella*.

3.3.3. Domínio Archaea

Os microorganismos do Domínio Archaea são considerados únicos, com propriedades metabólicas extraordinárias e filogenia particular. Compreendem os microorganismos anaeróbios mais sensíveis ao oxigênio, os termófilos mais extremos e halófilos cujas enzimas são adaptadas a elevadas concentrações salinas. Apesar da organização celular procariótica, são organismos evolutivamente distintos das bactérias (Domínio Bactéria), em função de características de organização do genoma, expressão gênica, composição celular e filogenia.(ADAMS², 1995 apud CANHOS & VAZOLLER, 1999).

As Archaea são divididas em três Reinos, representados pela Figura 3.7: Crenarchaeota, Euryarchaeota, e as Korarchaeota. Os estudos taxonômicos ainda são raros, com notável direcionamento para as espécies produtoras do gás metano, de ampla aplicação em tratamentos anaeróbios de resíduos e geração de biogás. (CANHOS & VAZOLLER, 1999).

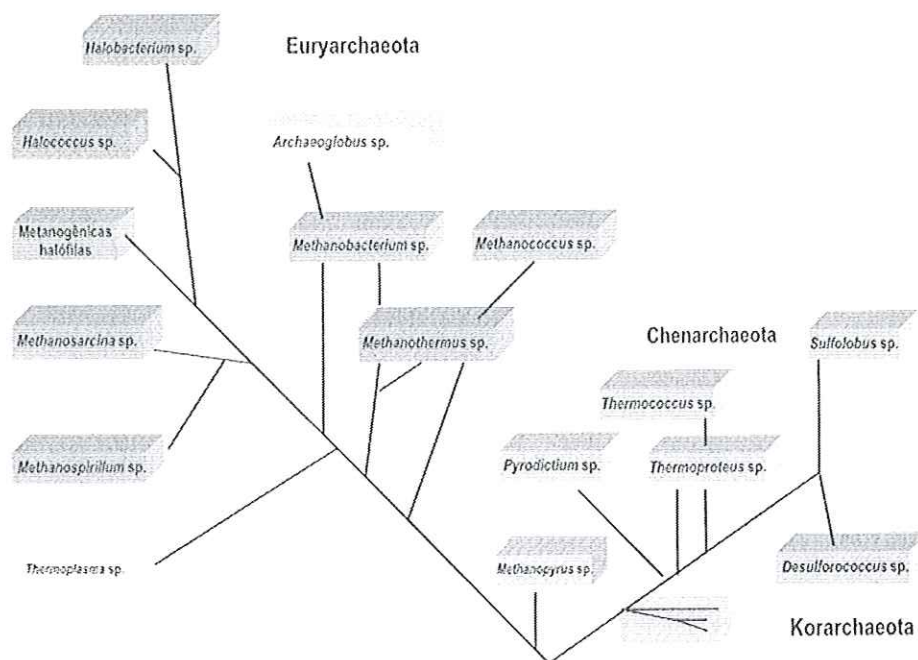


Figura 3.7: Árvore filogenética do Domínio Archaea, baseada na análise de seqüências do RNAr 16S (MADIGAN et al., 1997).

Os membros do Reino Crenarchaeota apresentam a ramificação mais profunda na árvore filogenética universal, contém as Archaea redutoras de enxofre hipertermófilas; representados por organismos dos gêneros *Desulfurococcus*, *Pyrodictium*, *Sulfolobus*, *Thermococcus*, *Thermofilum* e *Thermoproteus*. Em seguida, observam-se os grupos de *Euryarchaeota*, extremamente diversos, incluindo *Archaeoglobus* spp., os halófilos extremos *Halobacterium* spp. e *Halococcus* spp., os metanogênicos *Methanobacterium* spp., *Methanococcus* spp., *Methanosarcina* spp., *Methanospirillum* spp., *Methanothermus* e *Methanopyrus*, um metanogênico hipertermófilo, além das metanogênicas halófilas. O Reino Korarchaeota engloba organismos hipertermófilos pouco conhecidos ainda não-cultivados em laboratório (MADIGAN et al., 1997).

² ADAMS, M. W. W. 1995. Thermophilic Archaea: an overview. In: Archaea - a laboratory manual: Thermophiles. ROBB, F. T. & PLACE, A. R. (eds.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. P. 3-7 apud CANHOZ & VAZOLLER., 1999.

Na prática, as Archaea são estudadas e agrupadas de acordo com o seu metabolismo e fisiologia, sendo alocadas em diversos grupos, como: as metanogênicas, os halófilos extremos (ou hiperhalófilos) e os termófilos extremos (ou hipertermófilos) (CANHOS & VAZOLLER, 1999).

Várias espécies de Archaea são quimiorganotróficas, utilizando diferentes compostos orgânicos como fonte energética para o seu crescimento. É usual a ocorrência de Archaea com vias metabólicas semelhantes às encontradas em organismos do Domínio Bactéria. Entretanto, alguns organismos apresentam vias metabólicas raras, como as células metanogênicas, que, através de sistemas enzimáticos únicos, produzem o gás metano. O metabolismo autotrófico é muito usual entre as metanogênicas e muitos hipertermófilos (³SOWERS, 1995; ⁴MADIGAN et al., 1997 apud CANHOS & VAZOLLER 1999).

3.3.4. Archaeas Metanogênicas

“As Archaeas metanogênicas são microorganismos anaeróbios obrigatórios, que requerem condições anaeróbias de crescimento, e altamente redutoras, com potenciais de oxi-redução da ordem de -300 mV (³SOWERS, 1995 apud CANHOS & VAZOLLER 1999). Sua característica mais evidente está relacionada com sua especificidade de substrato para o crescimento e produção de metano. Até agora, os conhecidos são: formiato, monóxido de carbono, metanol, 2-propanol, aminas metiladas, dimetilsulfeto, metilmercaptanas e acetato, sendo universal o dióxido de carbono, que necessita de hidrogênio como doador de elétrons” (CANHOS & VAZOLLER, 1999).

“Os metanogênicos apresentam metabolismo quimiorganotrófico ou autotrófico. As Archaea metanogênicas atuam no passo final de consórcios microbianos presentes em sedimentos aquáticos, pântanos, sistemas de tratamento de resíduos, como digestores anaeróbios e aterros sanitários. Sob o ponto de vista ecológico, o metabolismo metanogênico é dependente da presença de outros microorganismos, cuja atividade no meio anaeróbio gera os precursores para a metanogênese” (VAZOLLER, 1995).

³ SOWERS, K. R. 1995. Methanogenic Archeae: na overview: In: Archaea - a laboratory manual: Methanogens. SOWERS, K. R. & SCHREIER, H J. (eds.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. P. 3-13 apud CANHOS & VAZOLLER, 1999.

⁴ MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. & PARKER, J. 1997. Brock biology of microorganisms. 8ª Ed. Caps. 15,16 e 17. New Jersey: Prentice-Hall. P. 606-768. apud CANHOS & VAZOLLER., 1999.

“As Archaeas representam um grupo de microorganismos polifilético, compreendendo 3 Ordens, com 8 Famílias e 21 Gêneros. Apresentam morfologia comum às células procarióticas, com forma de bacilos de diferentes tamanhos, cocos, sarcinas e filamentos. Alguns representantes apresentam propriedade de coloração de Gram-positiva e outros Gram-negativa, sendo a taxonomia baseada essencialmente em métodos moleculares, através de comparação de seqüências do RNAr 16S. Análises morfo-fisiológicas facilitam a classificação primária em relação ao gênero” (CANHOS & VAZOLLER, 1999).

A Ordem Methanobacteriales compreende a Família *Methanobacteriaceae*, com os gêneros *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* e *Methanosphaera*, contendo 18 espécies; e a Família Methanothermaceae, com o gênero *Methanothermus* e duas espécies. A Ordem Methanococcales congrega as Famílias Methanococcaceae, gênero *Methanococcus*, com 7 espécies; Methanomicrobiaceae, com os gêneros *Methanoculleus*, *Methanogenium*, *Methanoladina*, *Methanomicrobium* e *Methanospirillum*, com 13 espécies; Methanocorpusculaceae, gênero *Methanocorpusculum*, com 5 espécies; Methanoplanaceae, gênero *Methanoplanus*, com 2 espécies; Methanosarcinaceae, com os gêneros *Methanococcoides*, *Methanohalobium*, *Methanohalophilus*, *Methanolobus*, *Methanopyrus*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina* e *Methanothrix*, com 19 espécies (SOWERS, 1995). Algumas Archaea metanogênicas apresentam fluorescência sob iluminação ultravioleta decorrente da presença do cofator F₄₂₀ (VAZOLLER, 1995).

3.3.5. Domínio Eukarya – Reino Protista – Sub-reino Protozoa

Os protozoários são organismos unicelulares eucariontes e se reproduzem assexuadamente (fissão binária), sexuadamente (conjugação) ou por ambos os processos. Estes organismos apresentam estruturas como cílios, flagelos e pseudópodos, todas importantes no desempenho de funções como locomoção e alimentação. Os protozoários possuem considerável diversidade fisiológica e morfológica, adaptando-se a diferentes condições ambientais, ocupando vários nichos ecológicos (GODINHO e SELEGHIM, 1999).

Segundo LEE et al. (1985), o sub-reino Protozoa é formado por seis filos, divididos da seguinte forma: Filo Labyrinthomorpha constituído de sapróbios e parasitas de algas; filos Apicomplexa, Microspora e Myxozoa formados por protozoários parasitas; Filos Ciliphora (ciliados) e Sarcomastigophora (amebas, flagelados e heliozoários) compostos principalmente por protistas de vida livre.

As condições ambientais (clima, solo, vegetação, etc.) e fatores biológicos (predação, competição, etc.) influenciam a composição e a abundância das espécies encontradas nos diversos ambientes aquáticos. Da somatória dessas influências resultará a diversidade encontrada nos ambientes aquáticos (GILLER, 1984).

A identificação dos protozoários é baseada em características morfológicas, sendo a identificação mais difícil à medida que os organismos diminuem de tamanho, nestas situações, faz-se necessário o uso de técnicas de microscopia de varredura para se obter uma identificação segura (GODINHO e SELEGHIM, 1999).

Os protozoários podem ser algívoros, bacterívoros, carnívoros, omnívoros, osmotróficos ou mixotróficos, apresentando grande diversidade funcional em variados ambientes naturais (GODINHO e SELEGHIM, 1999). Em ambientes aquáticos, os protozoários se alimentam principalmente de células microbianas atuando como importantes remineralizadores de nutrientes, como fósforo e nitrogênio (AZAM et al., 1983; SHEER & SHERR, 1994). Os protozoários podem ainda hospedar arqueas metanogênicas, que são de importância significativa em ambientes anóxicos (FENCHEL & FINLAY, 1991).

Os protozoários são utilizados como indicadores de qualidade de água (SLÁDECEK, 1973) e são essenciais nos processos de autopurificação em sistemas de tratamento biológico de águas residuárias (CURDS, 1992). Além de ambientes aeróbios, aterros sanitários e reatores anaeróbios tratando esgoto sanitário proporcionam ambientes favoráveis para o desenvolvimento de protozoários anaeróbios.

Vários estudos constataram que energia necessária para o metabolismo dos protozoários ciliados anaeróbios estritos depende da fermentação e da fosforilação em nível de substrato (FENCHEL & FINLAY, 1991). Na década de 70 foi descoberto um protozoário flagelado anaeróbio (*Trichomonas*), o qual possuía organelas recobrando a sua membrana. A estas organelas deu-se o nome de hidrogenossomas, as quais têm como principal função oxidar o piruvato (oriundo do processo de glicólise) a acetato com concomitante produção de H_2 . O processo realizado por este protozoário para a obtenção de energia está ligado a fosforilação em nível de substrato (MÜLLER, 1980).

VOGELS et al. (1980) mostraram que arqueas metanogênicas freqüentemente são encontradas no interior de ciliados. Isto se dá devido ao fato que em ambientes anaeróbios a pressão parcial de hidrogênio apresenta valores muito baixos (por volta de 10^{-5} atm) devido ao alto consumo de H_2 pelos microorganismos hidrogenotróficos, inibindo assim o desenvolvimento das arqueas metanogênicas. Dentro dos organismos ciliados, no entanto, elas têm acesso ao H_2 e ao acetato que são excretados pelos ciliados através das

hidrogenossomas, e isto explica porque as arqueas metanogênicas são encontradas no interior desses organismos.

3.4. Formação e Caracterização Microbiológica do Biofilme Anaeróbio

A digestão anaeróbia de materiais orgânicos é um processo complexo realizado por várias populações de microorganismos presentes na forma de consórcio. A complexidade deste consórcio anaeróbio é refletida pelas inter-relações sintróficas e pela competitividade por substratos comuns entre diferentes populações. O grau de eficiência da digestão anaeróbia depende dos microorganismos presentes, por isso é importante se conhecer a composição microbiana do sistema e como ela varia de acordo com o uso de diferentes substratos (WOLF et al., 1999).

O uso de reatores anaeróbios contendo biomassa imobilizada representou grande avanço no desenvolvimento de processos anaeróbios de tratamento de águas residuárias. Vários suportes para a imobilização das células foram testados e usados em diferentes reatores para o tratamento de efluentes. Alguns deles podem ser mencionados: Agar (KARUBE et al., 1980; DEL NERY, 1993), acrilanamida (INAMORI et al., 1989), material cerâmico poroso (ZELLNER et al., 1987; KAWASE et al., 1989) e espuma de poliuretano (HUYSMAN et al., 1983; FYNN & WHITMORE, 1984; CALZADA et al., 1984; GIZGEN et al., 1988; FORESTI et al., 1995; ZAIAT et al., 1996).

Segundo HUYSMAN et al. (1983), é muito importante o conhecimento de como a biomassa adere ao suporte para prevenir o arraste da biomassa do reator, o que pode provocar o colapso do processo. Em seus estudos, eles testaram a capacidade de diferentes materiais na imobilização de arqueas metanogênicas, constatando que a espuma de poliuretano podia ser usada como matriz para a imobilização de biomassa. Além disso, verificaram que os fatores mais relevantes que afetaram a colonização das espumas de poliuretano foram a porosidade das matrizes e o tamanho dos seus poros, fatores estes que interferiram na difusão do substrato dentro da partícula.

FYNN & WHITMORE (1984) demonstraram que uma cultura de microorganismos enriquecida com arqueas metanogênicas pode ser imobilizada na superfície interna de espumas de poliuretano. Neste estudo, eles utilizaram reatores do tipo de mistura alimentados com formiato de sódio como única fonte de carbono, o que pode ter contribuído de alguma forma para a seleção dos microorganismos presentes. Os autores constataram que a colonização das espumas aumentava com a diminuição dos poros, pois espumas com 60

poros por polegada linear estavam mais densamente colonizadas do que matrizes com poros maiores (20, 30, 45 poros por polegada linear).

CALZADA et al. (1984) estudaram a degradação de polpa de café acidificada utilizando reatores metanogênicos de leito fixo de 0,15 e 12 L recheados com espumas de poliuretano. Seus resultados indicaram que este suporte é adequado para a retenção de biomassa em reatores tratando este tipo de efluente. Além disso, houve satisfatória conversão da matéria orgânica em metano.

VERRIER et al (1987) estudaram o fenômeno de aderência de quatro culturas puras de arqueas metanogênicas utilizando seis suportes poliméricos com diferentes propriedades em relação a hidrofobicidade da superfície. Eles concluíram que a aderência inicial de arqueas metanogênicas a suportes inertes é influenciada diretamente pelas características da superfície do microorganismo e do material de suporte. Além disso, os autores constataram que superfícies hidrofóbicas, politetrafluoretileno (PTFE), polipropileno e polietileno favorecem a aderência de arqueas que apresentam superfícies hidrofóbicas como as *Methanotrix soehngeni*. Em contraste, os autores observaram que a espécie *Methanosarcina mazei* não aderiu a nenhum suporte não sendo um microorganismo adequado para a formação de biofilmes em reatores de leito fixo.

GIJZEN et al. (1988) verificaram que os microorganismos aparentemente estão associados fisicamente com o material suporte (espuma de poliuretano). Os autores constaram o arraste de biomassa para velocidades superficiais superiores a $1,5 \text{ cm.s}^{-1}$. Além disso, eles observaram que o biofilme formado consistia principalmente de longos filamentos de archaeas do tipo *Methanosaeta* e um pequeno número de *Methanosarcinas sp.*, utilizando o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Mais tarde, ZAIAT et al. (1996) concluíram que as matrizes de poliuretano são completamente adequadas para a imobilização de biomassa anaeróbia, constatando ^{uma} perda de biomassa (sólidos suspensos voláteis) por arraste da ordem de 9% para velocidades superficiais superiores a $1,5 \text{ cm.s}^{-1}$.

CHENG et al. (1992) estudaram um reator de leito fluidificado com volume total de 5 m^3 , alimentado com efluente de concentração na faixa de 600 a 1000 mgDQO/L, oriundo de indústrias processadoras de alimentos (leite, carne, soja, refrigerantes). O leito era constituído de partículas cerâmicas. Durante o período de partida, apenas uma pequena quantidade de microorganismos com morfologias semelhantes a *methanosaeta* foi encontrada nos poros do material cerâmico, enquanto que um grande número de cocos e bacilos encontrava-se em suspensão ao longo do reator. Baixas cargas orgânicas foram aplicadas na etapa de partida para favorecer o desenvolvimento da biomassa. Com o

aumento da carga orgânica aplicada, houve acúmulo de ácidos voláteis promovendo a proliferação de cocos e bacilos os quais foram arrastados para fora do reator. As condições de operação foram modificadas de modo a tornar a operação mais estável, a biomassa foi novamente analisada, sendo constatada a presença de filamentosas recobrando os suportes cerâmicos. Depois da formação da colônia inicial, certos tipos de bacilos e pequenos cocos foram encontrados aderidos ao biofilme.

BRITZ et al. (1994) estudaram quatro digestores anaeróbios alimentados com diferentes substratos (esgoto sanitário, chorume, e efluente de indústria petroquímica). Em seus estudos determinaram, através de métodos taxonômicos, a diversidade das espécies presentes em cada digestor. Segundo os autores, os resultados obtidos indicaram que a composição das espécies dominantes no processo está intimamente ligada à composição do substrato utilizado.

ANDERSON et al (1994) estudaram as mudanças na população microbiana de um sistema de digestão anaeróbia de duas fases em termos do número de microorganismos e de sua composição durante o período de partida. O sistema de digestão consistia de um reator contínuo agitado funcionando como reator de pré-acidificação seguido de um filtro anaeróbio de fluxo ascendente correspondendo ao reator metanogênico. O efluente utilizado era oriundo de uma indústria de laticínios o qual possuía demanda química de oxigênio na faixa de 2000 a 6000 mg/L. O número de metanogênicas e não-metanogênicas decresceu durante a fase de partida em relação às populações microbianas encontradas no inóculo. Variações nas morfologias ocorreram ao longo do filtro, por exemplo, o número de methanosarcinas e bactérias filamentosas decresceu sensivelmente na base do filtro, enquanto que no reator de pré-acidificação, somente poucos espécimes de *Methanosarcinas* foram encontrados.

RASKIN et al. (1996) estudaram a competição e a coexistência entre populações de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e archaeas metanogênicas em biofilmes de reatores anaeróbios. Os autores utilizaram sondas de oligonucleotídeos de BRS e metanogênicas a fim de identificar a composição da população presente em cada reator. Em reatores que não apresentavam sulfato em sua alimentação, o consórcio microbiano apresentava uma população formada por 25% de archaeas metanogênicas (principalmente *Methanobacteriales*) e aproximadamente 15% de BRS (*Dessulfovibrio ssp.* e *Dessulfobacterium ssp.*). A presença de BRS na ausência de sulfato foi provavelmente devido à habilidade dessas bactérias em atuar como bactérias fermentativas e/ou acetogênicas.

Em estudos realizados por ZELLNER et al. (1996), a flora microbiana de um biorreator de leito fixo anaeróbio metanogênico, alimentado com acetato/propionato/butirato, foi estudada com o objetivo principal de investigar as espécies presentes e determinar a distribuição dos microorganismos entre os flocos livres e o biofilme aderido ao suporte de polipropileno. A concentração total de células nos flocos foi mais baixa que no biofilme aderido, no entanto, as células encontradas nos flocos estavam mais densamente concentradas. A flora microbiana presente no biofilme, observada *in situ* através da MEV, mostrou-se muito complexa. Foram encontrados cocos, bactérias filamentosas e bacilos, sendo que todas estas morfologias apresentavam vários tamanhos. Também foram encontradas archaeas as quais foram identificadas segundo a sua morfologia.

Estudos desenvolvidos por VARESCHE et al. (1997) constataram que os microorganismos aderem com firmeza às matrizes de poliuretano, provavelmente devido à formação de algum tipo de ligação. Neste estudo, microgrânulos de diferentes características e tamanhos foram identificados ao longo do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). Este fenômeno deve ter ocorrido devido à variação de concentração de substrato, resultando em diferentes razões de substrato/microorganismo ao longo do reator. A conformação espacial da biomassa encontrada dentro das matrizes de poliuretano apresentou estrutura não muito bem definida, no entanto, a conformação parecia otimizar os fluxos de substratos primário e produtos intermediários entre as espécies dentro das matrizes. Verificou-se que a utilização de reatores com esta conformação permitiu a aderência dos microorganismos às matrizes com maior rapidez, já que um menor nível de organização é requerido. Esta hipótese foi baseada nos baixos tempos de partida do reator horizontal observados por ZAIAT et al. (1997).

O conhecimento dos processos de granulação do lodo e formação do biofilme vem sendo aperfeiçoado devido a estudos da estrutura e composição biológica dos agregados celulares utilizando técnicas de microscopia ótica, de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Archaeas metanogênicas vem sendo facilmente identificadas por fluorescência utilizando comprimento de onda de 420 nm (ROBINSON et al., 1984; GROTENHUIS et al., 1991; ZELLMER et al., 1991). Com auxílio das técnicas mencionadas pode-se fazer a caracterização morfológica no máximo em relação ao gênero, como exemplo pode citar as sarcinas fluorescentes que são designadas como *Methanosarcinas sp.* As archaeas metanogênicas e as bactérias são identificadas segundo suas características morfológicas, fisiológicas e coloração de Gram (GUIOT et al., 1991; SANCHEZ et al., 1994).

O uso de suportes porosos na imobilização de biomassa em sistemas anaeróbios reduz o tempo de partida, permitindo a aplicação de altas taxas de carga orgânica, favorecendo o crescimento do biofilme (ALVES, et al., 1999). Segundo estes autores, o fenômeno de aderência depende das propriedades físico-químicas da superfície do suporte (porosidade, área superficial, rugosidade do material, distribuição do tamanho dos poros), pois estas propriedades determinam a capacidade de retenção das células. Eles ainda constataram que o tipo de suporte utilizado pode influenciar a atividade metanogênica devido às possíveis interações químicas entre o material, o meio líquido e os microorganismos envolvidos.

TOMMASO (1999) estudou a dinâmica do processo de formação do biofilme, incluindo a seqüência ecológica na colonização da espuma de poliuretano, utilizando gelatina (fonte de proteína) como base do substrato. A evolução do biofilme, a dinâmica de formação e as características da biomassa foram monitoradas em intervalos de tempo de 5 dias, permitindo a observação da seqüência de formação do biofilme, através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura e por microscopia ótica (contraste de fase e fluorescência). As primeiras amostras correspondentes ao sexto dia de operação, apresentavam cores amareladas ou negras dependendo da posição no reator.

O autor observou que, nas amostras amareladas, havia a predominância de pequenos bacilos semelhantes a *Clostridium*, sendo estas bactérias responsáveis pelo metabolismo de múltiplos aminoácidos na fase fermentativa. Bacilos curvos semelhantes a *Dessulfovibrio* e microorganismos com morfologias semelhantes a cocos também foram encontrados, sendo estes cocos provavelmente *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Bacilos e cocos predominaram nas amostras de coloração negra, podendo ser provavelmente associados as archaeas metanogênicas (*Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* e *Methanococcus*), todas estas hidrogenotróficas.

Todas as amostras coletadas no décimo primeiro dia apresentaram coloração negra. Os microorganismos citados anteriormente estavam presentes nestas amostras ao lado de outros três tipos de morfologias: bacilos grandes e bactérias filamentosas (pertencentes aos gêneros *Clostridium* ou *Eubacterium*), e algumas com morfologia típica de *Spirochaeta*.

Morfologias semelhantes a *Methanosaeta* foram encontradas nas amostras do décimo sexto dia, mas em pequenas quantidades. As análises por microscopia de fluorescência permitiram verificar o expressivo crescimento das archaeas metanogênicas a partir do décimo primeiro até o décimo sexto dia. As amostras coletadas no vigésimo segundo dia apresentaram a predominância de archaeas metanogênicas fluorescentes, além da presença das outras morfologias relacionadas à fase fermentativa acidogênica.

3.5. Considerações Finais

As informações obtidas, a partir da literatura, permitiram a ampliação dos conhecimentos referentes a colonização de suportes em reatores anaeróbios de biomassa imobilizada. Essas informações, possibilitaram um maior entendimento das rotas de degradação dos substratos utilizados, além do maior conhecimento dos microorganismos envolvidos. Através da revisão bibliográfica, pode-se entender melhor o fenômeno da aderência de microorganismos a suportes inertes e suas etapas, auxiliando assim nas discussões dos resultados obtidos neste trabalho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para atingir os objetivos propostos no trabalho, foi utilizado um sistema composto por reatores diferenciais contendo suportes para a imobilização da biomassa. Este sistema foi utilizado por ZAIAT et al. (1997) para a estimativa de parâmetros cinéticos e, posteriormente, TOMMASO (1999) para a avaliação da dinâmica de aderência. Baseado nos trabalhos prévios, o aparato foi modificado e aprimorado para a realização deste projeto.

4.1. Aparato Experimental

O aparato experimental era constituído primeiramente de sete reatores diferenciais operando em paralelo; instalados em uma câmara com temperatura controlada de 25°C; um frasco Duran de 1 L onde o meio era mantido sob agitação em banho de gelo; um agitador magnético; um banho termostaticado que funcionou como trocador de calor; uma bomba peristáltica Watson-Marlow com quatro canais nos ciclos utilizando glicose e amido como substratos. Nos ciclos alimentados com óleo de soja, extrato de carne e esgoto sintético utilizou-se uma bomba peristáltica Gilson Miniplus de quatro canais. A representação esquemática do aparato experimental utilizado é descrita na Figura 4.1.

Os reatores utilizados neste trabalho apresentavam volume total de 15 mL, com 2,9 cm de diâmetro e 2,4 cm de comprimento. O escoamento nos reatores era horizontal. Na entrada e na saída dos reatores foram acopladas redes de plástico as quais proporcionavam melhor distribuição de fluxo, diminuindo a presença de caminhos preferenciais e zonas mortas dentro dos reatores. Estas redes na saída dos reatores impediam o arraste das matrizes de poliuretano e a conseqüente perda de biomassa imobilizada.

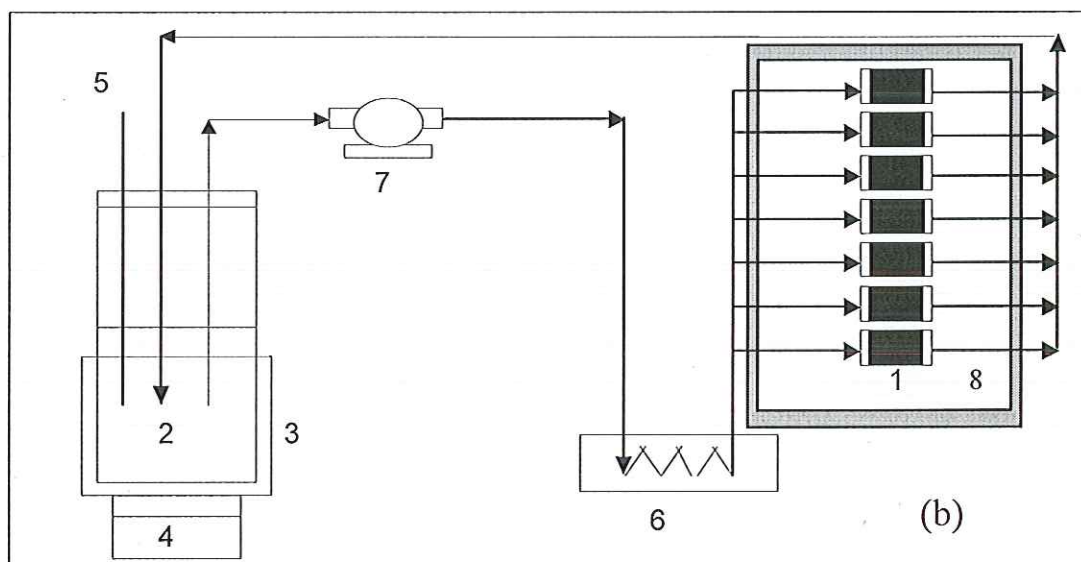
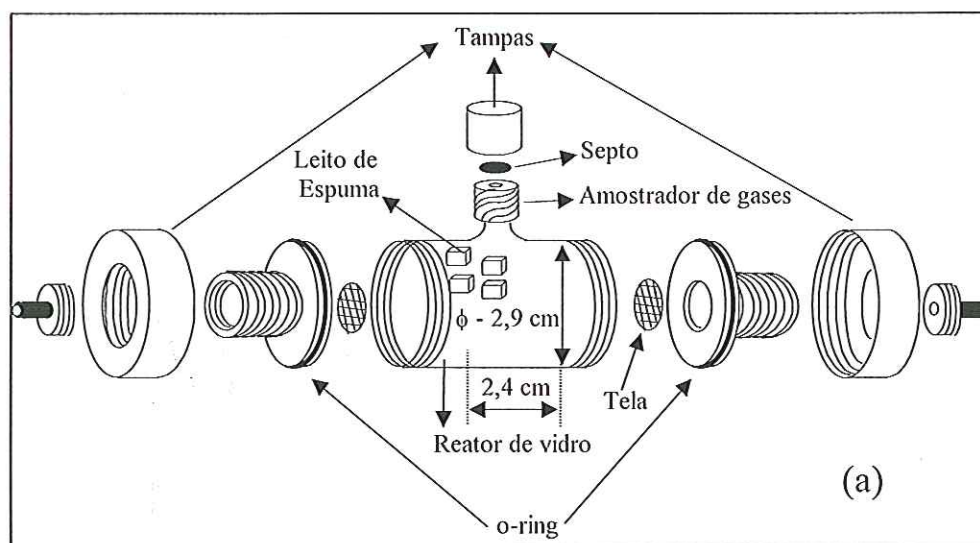


Figura 4.1: (a) Desenho esquemático do reator diferencial; (b) Aparato Experimental (1. Reatores diferenciais; 2. Recipiente sob agitação; 3. Banho de gelo; 4. Agitador magnético; 5. Amostrador de substrato; 6. Trocador de calor; 7. Bomba, 8. Câmara termostataizada).

4.2. Suporte de Imobilização

Partículas de espuma de poliuretano em cubos de 5 mm de aresta, com densidade de 23 g/cm^3 e porosidade entre 92 a 96% (Edmil Indústria e Comércio Ltda.), foram usadas como recheio dos reatores diferenciais horizontais. Cada reator diferencial continha 60 cubos de espuma, perfazendo uma porosidade de leito aproximada de 40%. Este suporte mostrou-

se completamente adequado à imobilização de biomassa anaeróbia (ZAIAT et al. 1996) sendo amplamente utilizada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Processos Biológicos da EESC/USP apresentando bons resultados.

4.3. Inóculo

O inóculo utilizado foi obtido do reator UASB, usado no tratamento de águas residuárias provenientes de abatedouro de aves (Dacar Industrial S.A.), localizado no município de Tietê, SP. Escolheu-se o inóculo deste reator por estar operando com alta eficiência e grande estabilidade por um bom espaço de tempo. Além do mais, estes reatores são alimentados com efluentes constituídos de lipídios, carboidratos e proteínas, sendo a influência destes substratos na aderência às matrizes de poliuretano o objetivo deste trabalho.

Foi realizada a caracterização morfológica do inoculo através de microscopia de contraste de fase e fluorescência. As amostras foram mantidas na geladeira para melhor conservação durante o período de execução da fase experimental.

4.4. Substratos

A fase experimental foi constituída de 6 etapas, cada qual utilizando um substrato diferente na alimentação do reator diferencial, a saber, extrato de carne, glicose, amido, lipídeos e esgoto doméstico sintético. A composição química da última condição foi preparada de acordo com TORRES (1992). O extrato de carne era constituído de aproximadamente 63% de proteína segundo análises realizadas.

Em cada etapa, o substrato foi preparado com demanda química de oxigênio (DQO) inicial aproximada de 500 mg.L⁻¹. Para as quatro primeiras etapas, as concentrações de substrato utilizadas, correspondentes a DQO de 500 mg.L⁻¹, estão descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Concentrações de substratos correspondentes a DQO de 500 mg/L .

Etapa	Substrato	Concentração (mg/L)	Relação $C_{DQO}/C_{SUBSTRATO}$
1ª	Glicose	500	1,00
2ª	Amido	476	1,05
3ª	Óleo de Soja*	510	0,98
4ª	Extrato de Carne	417	1,20

*Foram adicionadas 30 gotas de detergente comercial por litro de solução para emulsionar o óleo.

Em todas as etapas utilizou-se a concentração de 200 mg/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a fim de tamponar o meio numa faixa de pH adequada. Para cada uma das 5 etapas do trabalho utilizou-se a concentração de 300mg SSV/L no meio líquido (von SPERLING, 1997), simulando o esgoto sanitário, atuando como inóculo para o sistema. Já nas três primeiras etapas, adicionou-se também uréia à concentração de 100 mg/L para garantir a quantidade necessária de nitrogênio para a realização da digestão anaeróbia. Em todas as etapas foram adicionados sais minerais de modo que as suas concentrações na solução de alimentação dos reatores tivessem concentrações semelhantes às encontradas no esgoto sanitário (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Concentração de sais minerais na água residuária sintética.

Sal	Concentração (mg/L)
NaCl	250
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	7
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.5

(TORRES, 1992).

Na 5ª etapa utilizou-se o substrato complexo com composição descrita na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Composição do esgoto sintético para concentração de 500 DQOm/L.

Composto	Concentração (mg/L)	Concentração (mgDQO/L)
Carboidratos		
Sacarose	35	40
Amido	114	120
Celulose	34	40
Proteínas		
Extrato de carne	208	250
Lipídios		
Óleo de soja*	51 (0,056 mL)	50
Sais		
NaCl	250	
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	7	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.5	
Tampão		
NaHCO_3	200	

Fonte: (TORRES, 1992).

*Foram adicionados 3 gotas de detergente comercial por litro de solução para emulsionar o óleo.

4.5. Métodos Analíticos

Durante a execução de cada etapa foram monitorados os seguintes parâmetros: DQO segundo método descrito pela APHA (1995); Ácidos Voláteis Totais (AVT), Alcalinidade como CaCO_3 , e pH de acordo com metodologia descrita por RIPLEY et al. (1986). Não foi possível analisar a composição do biogás gerado devido à baixa produção de gás no sistema.

A quantificação de biomassa aderida às matrizes de poliuretano se deu de maneira indireta, na forma de sólidos voláteis totais segundo método descrito pela APHA (1995). Os polímeros extracelulares foram quantificados em termos de proteínas segundo o método de LOWRY modificado por PETERSON (1987), utilizando soro albumina bovina como padrão, e carboidratos segundo o método de DUBOIS et al. (1956) utilizando lactose como padrão.

4.6. Procedimento Experimental

A influência do substrato na aderência da biomassa anaeróbia em espumas de poliuretano foi avaliada através do acompanhamento da evolução do biofilme ao longo do tempo nos reatores diferenciais. Tal evolução foi monitorada através de observações microscópicas dos microorganismos aderidos ao suporte ao longo do tempo, além do acompanhamento temporal das concentrações de sólidos voláteis aderidos as espumas e dos polímeros excretados.

4.6.1. Operação do Sistema de Reatores Diferenciais

Diariamente, o lodo usado como inóculo era macerado para que se desfizessem os grânulos, obtendo-se uma biomassa homogênea em suspensão. A este lodo macerado foi adicionado o substrato da etapa correspondente. O sistema foi mantido, em um recipiente fechado, pelo período de 24 horas, à temperatura constante de 25°C, para a adaptação das células às novas condições nutricionais. Em seguida adicionou-se parte desta mistura à solução que alimentava os reatores, resultando em concentração final de aproximadamente 300 mg de sólidos em suspensão voláteis - SSV/L.

No sistema descrito pela Figura 4.1, um volume de 500 mL de substrato era recirculado em circuito fechado. Primeiramente, o sistema era alimentado através de um recipiente de 1 L sob agitação o qual era mantido em banho de gelo a 5°C para minimizar a

ocorrência de reações bioquímicas fora dos reatores diferenciais. Bombeava-se o substrato até o trocador de calor onde era aquecido até a temperatura de 25°C antes de entrar nos reatores, os quais estavam em uma câmara com temperatura controlada de 25 °C. Após sair dos reatores, o substrato retornava ao recipiente original.

A velocidade superficial do líquido utilizada dentro do reator foi de 0,03 cm.s⁻¹, sendo determinada de acordo com a seguinte expressão:

$$V_s = \frac{Q}{\varepsilon^* A} \quad (1)$$

Onde Q é a vazão do líquido, A é a área da seção transversal do reator e ε é a porosidade do meio.

A fase experimental constituiu-se de 6 etapas, cada qual utilizando um substrato diferente na alimentação do reator diferencial (extrato de carne, glicose, amido, lipídeos e esgoto sanitário sintético).

Utilizou-se em cada etapa sete reatores operando em paralelo. Cada reator era retirado do sistema e desmontado em diferentes dias ao longo do ciclo (4°, 7°, 10°, 13°, 16°, 21° e 24° dia). O substrato era trocado a cada 24 horas, sendo que o novo meio possuía demanda química de oxigênio (DQO) inicial de aproximadamente 500 mg DQO/L e 300 mg SSV/L. Para garantir as condições de anaerobiose fluxionou-se diariamente nitrogênio no frasco de alimentação durante 15 minutos após a troca do substrato. Manteve-se um “head-space” em torno de 50% com N₂ (100%) (HUNGATE, 1969).

No final do ciclo de operação de cada reator diferencial, este era desmontado e se coletavam amostras das matrizes de espuma de poliuretano para análises, através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia ótica. A partir dessas amostras, também era realizada a quantificação de biomassa e dos polímeros extracelulares presentes nas espumas. Amostras do substrato no início e ao final das bateladas correspondentes aos dias em que reatores eram retirados, também eram coletadas, e em seguida, os seguintes parâmetros eram analisados: DQO; Ácidos Voláteis Totais (AVT); Alcalinidade; pH.

4.6.2. Caracterização Microbiológica do Biofilme Anaeróbio

Para as análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram preparadas segundo a técnica desenvolvida por NATION (1983) e adaptada por ARAÚJO (1994) para biofilmes microbianos. Em uma primeira etapa de fixação do biofilme, estas amostras foram mantidas em solução tampão de fosfato 0,1 M (pH = 7,3) contendo 2,5% de glutaraldeído por 12 h e 4°C. Depois da etapa de fixação, as amostras foram lavadas três vezes por uma solução tampão de fosfato 0,1 M (pH = 7,3) e desidratadas gradualmente depois de sucessivas imersões em soluções de etanol sob gradiente crescente de concentração (50%, 70%, 80%, 90%, 95%) durante 10 minutos cada. As amostras então foram lavadas três vezes em etanol 100% (PA) durante 10 minutos e depois imersas em hexametildisilazane (HMDS) por 30 segundos. As espumas preenchidas com o biofilme foram coladas ao suporte com esmalte incolor e em seguida transferidas para a estufa a temperatura inferior a 50°C, por aproximadamente 2 horas. A seguir, elas foram submetidas ao recobrimento com ouro para análise posterior. As análises por SEM foram feitas utilizando um microscópio de varredura digital Zeiss DSM-960.

Para as análises por microscopia ótica, as matrizes de espuma de poliuretano foram lavadas com água destilada e, logo em seguida, examinadas por microscopia de contraste de fase. A epifluorescência foi verificada utilizando luz ultravioleta conectada a um microscópio Olympus BH - 2. As imagens foram captadas utilizando uma câmera Ophionix acoplada ao software *Image Pro Plus*.

4.6.3. Quantificação da Biomassa Aderida

Para quantificar a biomassa aderida ao suporte, foram pesados 5 cubos de espuma retirados do reator diferencial e transferidos para um frasco de 40 mL. A estes cubos foram adicionadas pérolas de vidro, em quantidade quatro vezes maior em relação à massa de espuma pesada, e 10 mL de água destilada. Em seguida, lacrou-se o frasco e promoveu-se a agitação do mesmo, em ângulo de 45°, durante 20 minutos para que a biomassa aderida soltasse das matrizes de espuma.

O líquido foi separado das pérolas de vidro e das espumas para em seguida ser transferido para tubos de polipropileno de 15 mL. Foram utilizados mais 5 mL de água destilada para a lavagem das pérolas de vidro. Todo líquido utilizado foi transferido para o tubo, perfazendo um volume final de 15 mL. As espumas foram levadas para uma estufa

com temperatura de 100°C, onde permaneceram por 24 horas. Posteriormente, as espumas foram transferidas para o dessecador até que se atingisse a temperatura ambiente, em seguida, as espumas foram pesadas (P_{E1}).

O líquido foi centrifugado por 10 minutos a frequência de 3500 rpm. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os sólidos foram ressuspensos com 10 mL de água destilada, sendo transferidos para uma cápsula de porcelana previamente pesada (P_0), e mantidos em estufa temperatura de 100°C, por 24 horas. Logo após, a cápsula foi pesada (P_1). Na última etapa, a cápsula foi transferida para a mufla, ajustada para temperatura de 550°C, onde permaneceu por 2 horas. Em seguida pesou-se novamente a cápsula obtendo-se o valor de (P_2).

Este procedimento foi repetido para cada reator retirado do sistema.

Os valores de sólidos suspensos totais por grama de espuma e sólidos suspensos voláteis por grama de espuma foram, então, obtidos a partir das seguintes expressões:

$$ST = \frac{(P_1 - P_0)}{P_{E1}} \quad (2)$$

$$SVT = \frac{(P_1 - P_2)}{P_{E1}} \quad (3)$$

O fluxograma do procedimento experimental para a quantificação da biomassa aderida às matrizes de poliuretano é apresentado na Figura 4.2.

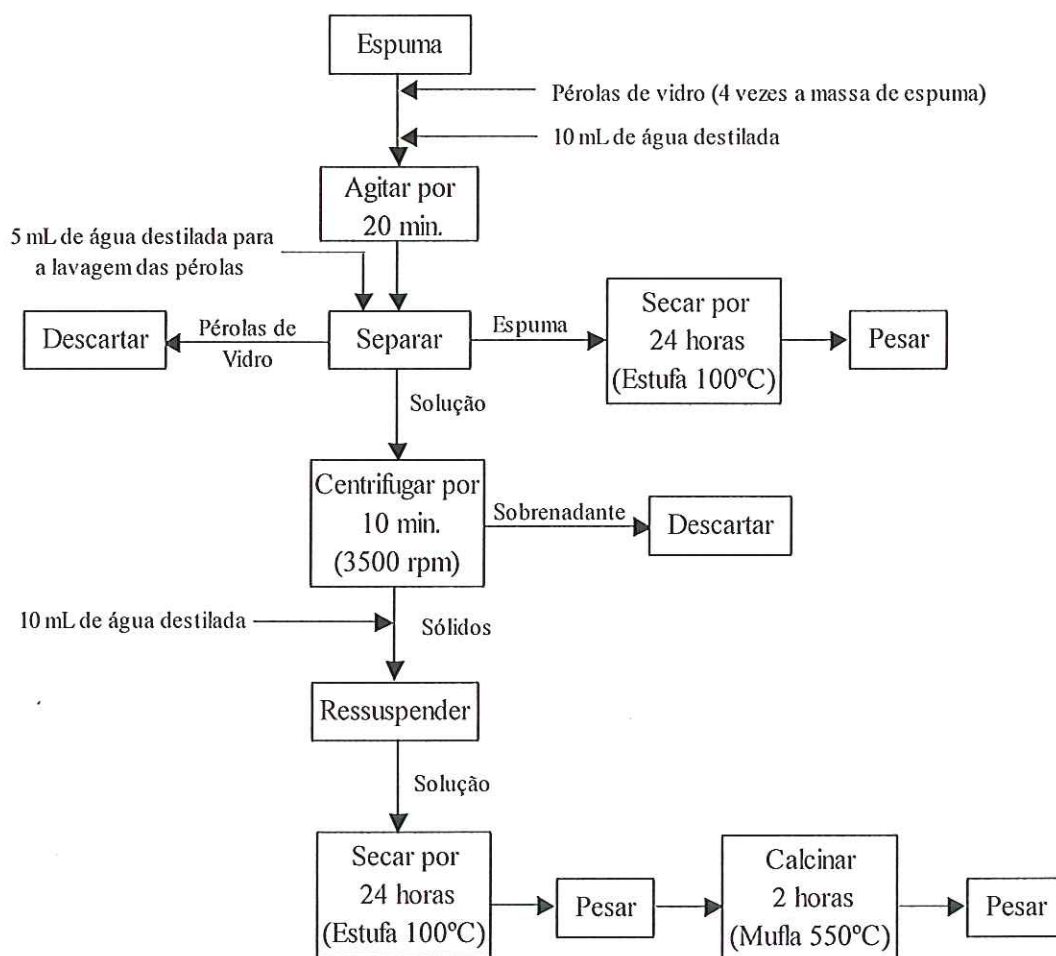


Figura 4.2: Fluxograma do procedimento experimental para a quantificação da biomassa aderida às matrizes de poliuretano.

4.6.4. Quantificação de Polímeros Extracelulares Excretados

De maneira análoga ao procedimento utilizado para a quantificação de biomassa, foram pesados 5 cubos de espuma retirados do reator diferencial. Em seguida as espumas foram transferidas para um frasco de 40 mL, no qual foram adicionadas pérolas de vidro, em quantidade quatro vezes maior em relação à massa de espuma pesada, além de 10 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,9%. Em seguida, lacrou-se o frasco e promoveu-se a agitação do mesmo durante 20 minutos para que a biomassa aderida soltasse das matrizes de espuma.

O líquido foi separado das pérolas de vidro e das espumas para em seguida ser transferido para tubos de polipropileno de 15 mL. Foram utilizados mais 5 mL de solução de NaOH 0,9% para a lavagem das pérolas de vidro, os quais foram também transferidas para o

tubo, perfazendo um volume final de 15 mL. As espumas foram levadas para a estufa, ajustada para temperatura de 100°C, onde permaneceram por 24 horas. Em seguida, as espumas foram pesadas (P_{E2}).

O líquido foi centrifugado por 10 minutos a frequência de 3500 rpm. Depois da centrifugação o sobrenadante foi descartado e os sólidos foram ressuspensos com 5 mL de uma solução de padrão (NaOH 8,5% e formaldeído 0,22%). Esta solução permite a extração dos polímeros extracelulares, diminuindo a ocorrência de lise da membrana citoplasmática, minimizando a interferência, devido à presença de material intracelular, nos métodos de quantificação de polímeros.

Em seguida, o tubo foi resfriado em banho de gelo, e em seguida foi levado para o homogeneizador de 40 W durante 3 minutos. O líquido foi novamente centrifugado por 30 minutos a frequência de 12000 rpm. Logo a seguir, os polímeros extracelulares foram quantificados em termos de proteínas segundo o método de LOWRY modificado por PETERSON (1977), utilizando soro albumina bovina (SAB) como padrão, e de carboidratos segundo o método de DUBOIS et al. (1956) utilizando lactose como padrão.

Este procedimento, do mesmo modo que na de quantificação de biomassa, foi repetido para cada reator retirado do sistema.

Os valores de polipeptídios (proteína) por grama de espuma, polissacarídeos por grama de espuma, polipeptídios por grama de SSV e polissacarídeos por grama de SSV podem ser obtidos a partir das seguintes expressões:

$$mg\ Pr\ ot./\ gEspuma = \frac{C_{Pr\ ot.} * V_{Sol.Padrão}}{P_{E2}} \quad (4)$$

$$mg\ Carb./\ gEspuma = \frac{C_{Carb.} * V_{Sol.Padrão}}{P_{E2}} \quad (5)$$

$$mg\ Pr\ ot./\ gSVT = \frac{mg\ Pr\ ot./\ gEspuma}{SVT} \quad (6)$$

$$mg\ Carb./\ gSVT = \frac{mg\ Carb./\ gEspuma}{SVT} \quad (7)$$

O fluxograma do procedimento experimental para a quantificação de polímeros extracelulares excretados pela biomassa aderida às matrizes de poliuretano é apresentado na Figura 4.3.

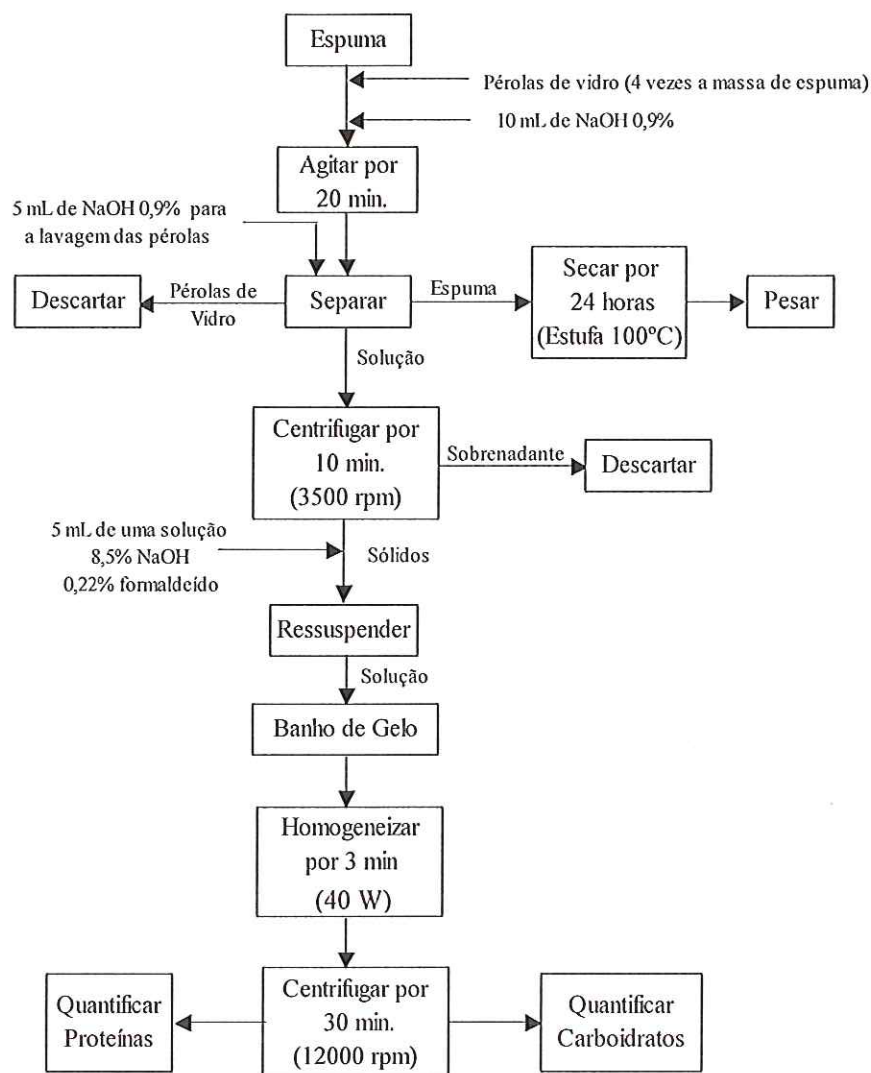


Figura 4.3: Fluxograma do procedimento experimental para a quantificação de polímeros extracelulares excretados pela biomassa aderida às matrizes de poliuretano.

4.6.5. Identificação de Polímeros Extracelulares Excretados

Os polímeros extracelulares foram identificados segundo técnica desenvolvida por PASSOW & ALLDREDGE (1995) a qual possibilita a identificação de polímeros carboxilados e sulfatados.

Primeiramente preparou-se 10 mL de solução de ácido acético 0,06% (pH 2,5). Logo após acrescentou-se 0,002 g de Alcian Blue. Filtrou-se a solução para a retirada dos flocos formados, e em seguida aplicou-se cerca de 500 μ L desta solução diretamente sobre da amostra, a qual se encontrava depositada em lâmina de vidro. Após 5 segundos, lavou-se a

amostra com água destilada sendo, em seguida, observada no microscópio. As regiões que apresentaram coloração azul indicaram a presença de polímeros ácidos (carboxilados).

Para a identificação de polímeros sulfatados, primeiramente pipetou-se 10 mL de água destilada, baixou-se o pH para aproximadamente 0,5 com HCl concentrado, e acrescentou-se 0,002 g de Alcian Blue. Filtrou-se a solução e em seguida aplicou-se cerca de 500 μ L diretamente sobre a amostra, deixando por menos de 5 segundos. Lavou-se a amostra com água destilada, sendo em seguida observada sob microscopia ótica de luz comum. As regiões que apresentaram coloração azul, neste caso indicaram a presença de polímeros sulfatados.

É importante ressaltar que esta metodologia é válida apenas para a detecção de polímeros ácidos e sulfatados. No caso da amostra não apresentar coloração, isto não significa que esta não contenha polímeros, pois polímeros neutros podem estar presentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Monitoramento do Sistema

Os parâmetros de concentração de ácidos voláteis (AVT), alcalinidade a bicarbonato (AB) e matéria orgânica, medida de maneira indireta através da demanda química de oxigênio, serviram de parâmetros de monitoramento para garantir as condições adequadas para o desenvolvimento do biofilme anaeróbio durante os cinco ciclos utilizando substratos diferentes. Os valores dos parâmetros de monitoramento para os substratos utilizados na alimentação dos reatores estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Dados de monitoramento do afluente para os diferentes substratos utilizados na alimentação dos reatores.

Substrato	DQO (mg / L)	pH	AB (mg CaCO ₃ /L)	AVT (mg CH ₃ COOH/L)
Glicose	543,0 ± 22,7	7,3 – 7,8	140,1 ± 20,6	9,1 ± 0,9
Amido	484,9 ± 71,1	7,6 – 8,1	135,4 ± 13,7	9,5 ± 2,5
Óleo de soja	493,9 ± 174,0	7,6 – 8,0	137,1 ± 9,7	8,0 ± 1,7
Extrato de carne	451,4 ± 7,0	7,5 – 7,7	139,2 ± 8,2	33,1 ± 1,1
Esgoto sintético	503,3 ± 63,6	7,5– 7,9	150,4 ± 8,2	21,9 ± 2,1

As variações dos parâmetros de monitoramento ao longo do tempo de operação estão apresentadas nas Figuras 5.1 a 5.3. De acordo com estes gráficos, as condições necessárias para a atividade microbiana foram mantidas em todas as etapas.

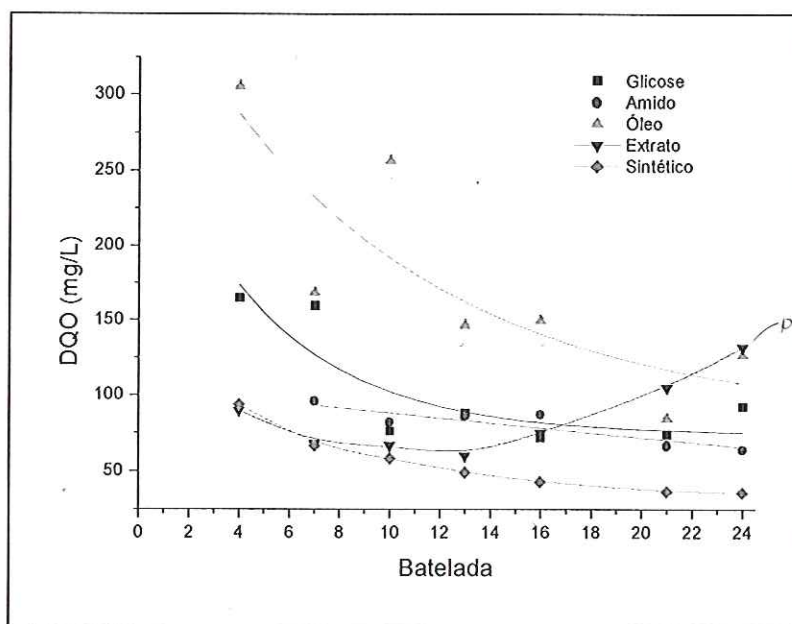


Figura 5.1: Concentração de matéria orgânica (medida em termos de DQO – mg/L), para cada batelada, para cada substrato utilizado.

De acordo com a Figura 5.1, os ciclos que utilizaram glicose, óleo e esgoto sintético como substrato apresentaram comportamentos muito semelhantes, referentes à degradação de matéria orgânica, podendo ser descritos segundo modelos de decaimento exponencial. Ao final dos ciclos utilizando glicose e esgoto sintético como substrato, estes apresentaram concentração final de matéria orgânica abaixo de 100 mg DQO/L. Já o ciclo alimentado com óleo de soja apresentou grande variabilidade nas medidas de DQO, provavelmente devido à dificuldade na solubilização do mesmo. Pôde-se constatar também uma maior concentração final de matéria orgânica no término desta etapa, o que pode ser atribuído à baixa biodisponibilidade do óleo de soja devido também a sua reduzida solubilidade na água.

A etapa utilizando amido na alimentação dos reatores apresentou pequena variação na concentração de matéria orgânica ao final das bateladas, mantendo-se abaixo de 100 mg DQO/L.

O ciclo utilizando extrato de carne apresentou comportamento distinto. Até o 16º dia, correspondente a 16ª batelada, este apresentou tendência semelhante aos demais, no entanto, a partir do 21º dia (21ª batelada), ocorreu um aumento da DQO de saída, sendo este comportamento constatado até o final (24º dia e/ou batelada). Este fato pode ser devido a maior sensibilidade desse sistema à retirada de reatores ao longo da operação e a conseqüente diminuição da biomassa disponível para a degradação da matéria orgânica.

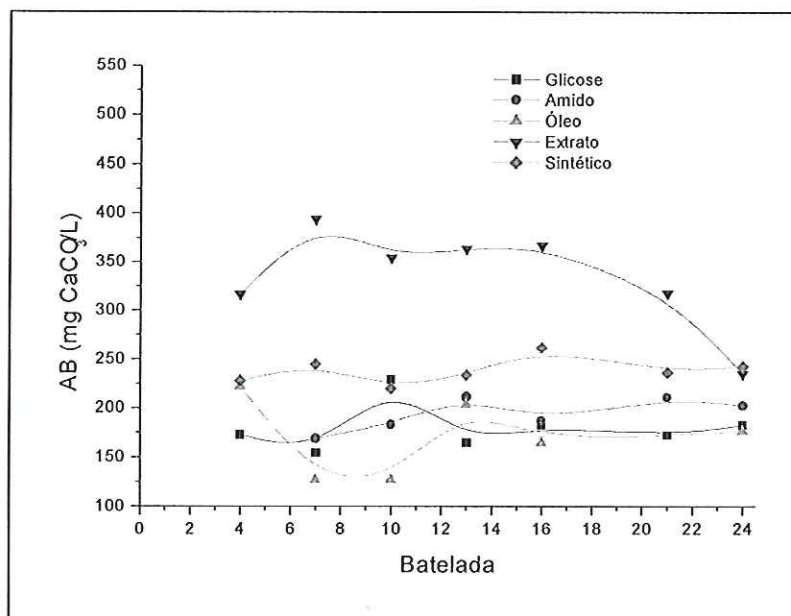


Figura 5.2: Valores de alcalinidade a bicarbonato (medida em termos de mg CaCO_3/L), para cada batelada, para os substratos utilizados.

A partir da Figura 5.2, pode-se constatar que a alcalinidade a bicarbonato apresentava-se em faixa adequada para o desenvolvimento da biomassa anaeróbia. Vale ressaltar a queda nos valores de alcalinidade para o ciclo utilizando extrato de carne a partir do 21º dia. Esta queda na alcalinidade coincide com o aumento da DQO de saída. Esta tendência foi mantida até o final do ciclo (24º dia).

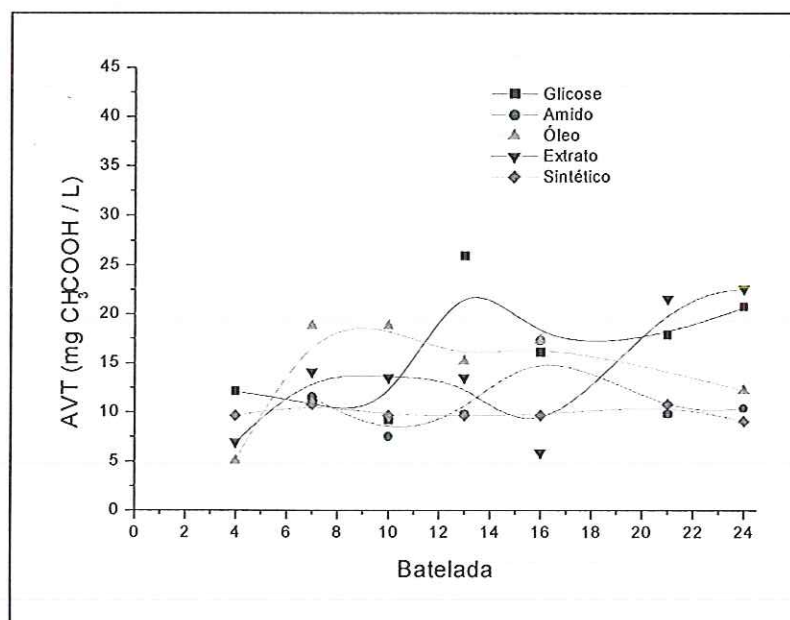


Figura 5.3: Concentração de ácidos voláteis (medida em termos de mg $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{L}$), para cada batelada, para os substratos utilizados.

Pode-se constatar na Figura 5.3 que a concentração de ácidos voláteis se manteve baixa em todos os experimentos. Foi observado o aumento nos valores das concentrações de ácidos a partir do 21º para o ciclo utilizando extrato de carne. Este fato ocorreu concomitantemente com a queda na alcalinidade e com o aumento da DQO de saída.

Os dados de monitoramento apresentados, embora indiquem a estabilidade dos sistemas e o aumento da atividade microbiana ao longo do tempo, devem ser analisados com cautela, pois a concentração de biomassa varia com o tempo em decorrência da retirada dos reatores diferenciais para observações microscópicas.

5.2. Crescimento de Biomassa e Excreção de Polímeros

Os dados referentes ao crescimento da biomassa e à excreção de polímeros ao longo dos ciclos para os substratos utilizados foram obtidos de acordo com os itens 4.6.3. e 4.6.4, e são apresentados nas Tabelas 5.2 a 5.6.

Tabela 5.2: Dados referentes ao crescimento da biomassa e à excreção de polímeros para a etapa utilizando glicose como substrato.

Dia	SVT/Espuma g SVT/g Espuma	C _{carb./Espuma} mg Carb./g Espuma	C _{carb./SVT} mg Carb./g SVT	C _{prot./Espuma} mg Prot./g Espuma	C _{prot./SVT} mg Prot./ g SVT
4	0,43	10,1	23,5	3,3	7,7
7	0,45	17,3	38,5	5,3	11,9
10	0,46	21,5	46,7	6,1	13,2
13	0,81	34,6	42,6	7,5	9,3
16	1,41	45,8	32,5	9,6	6,8
21	1,60	49,8	31,1	11,6	7,3
24	1,59	49,8	31,2	12,2	7,6

Tabela 5.3: Dados referentes ao crescimento da biomassa e à excreção de polímeros para a etapa utilizando amido como substrato.

Dia	SVT/Espuma g SVT/g Espuma	C _{carb./Espuma} mg Carb./g Espuma	C _{carb./SVT} mg Carb./g SVT	C _{prot./Espuma} mg Prot./g Espuma	C _{prot./SVT} mg Prot./ g SVT
4	0,56	23,8	42,4	2,5	4,5
7	0,57	29,1	50,7	3,3	5,8
10	0,61	32,8	53,8	3,8	6,3
13	1,16	51,7	44,7	4,9	4,2
16	1,30	51,8	39,8	6,4	4,9
21	1,48	54,0	36,5	8,6	5,8
24	1,65	57,7	35,0	11,8	7,1

Tabela 5.4: Dados referentes ao crescimento da biomassa e à excreção de polímeros para a etapa utilizando óleo como substrato.

Dia	SVT/Espuma g SVT/g Espuma	$C_{carb./Espuma}$ mg Carb./g Espuma	$C_{carb./SVT}$ mg Carb./g SVT	$C_{prot./Espuma}$ mg Prot./g Espuma	$C_{prot./SVT}$ mg Prot./ g SVT
4	0,35	45,2	127,9	5,3	14,9
7	0,63	50,7	80,9	6,0	9,6
10	0,92	46,9	51,2	5,7	6,3
13	1,07	43,8	40,8	5,2	4,8
16	1,23	50,6	41,1	6,5	5,3
21	1,30	60,9	47,0	6,5	5,0
24	1,52	70,5	46,3	8,4	5,5

Tabela 5.5: Dados referentes ao crescimento da biomassa e à excreção de polímeros para a etapa utilizando extrato de carne como substrato.

Dia	SVT/Espuma g SVT/g Espuma	$C_{carb./Espuma}$ mg Carb./g Espuma	$C_{carb./SVT}$ mg Carb./g SVT	$C_{prot./Espuma}$ mg Prot./g Espuma	$C_{prot./SVT}$ mg Prot./ g SVT
4	0,60	65,1	109,2	6,3	10,6
7	0,62	47,6	76,9	6,0	9,6
10	0,70	42,1	60,0	6,1	8,7
13	1,04	50,3	48,4	6,3	6,1
16	1,43	57,0	39,8	6,1	4,3
21	1,69	61,6	36,4	7,0	4,2
24	1,69	63,8	37,7	8,5	5,0

Tabela 5.6: Dados referentes ao crescimento da biomassa e à excreção de polímeros para a etapa utilizando esgoto sintético como substrato.

Dia	SVT/Espuma g SVT/g Espuma	$C_{carb./Espuma}$ mg Carb./g Espuma	$C_{carb./SVT}$ mg Carb./g SVT	$C_{prot./Espuma}$ mg Prot./g Espuma	$C_{prot./SVT}$ mg Prot./ g SVT
4	0,84	62,9	74,9	6,8	8,1
7	0,82	47,1	57,7	6,8	8,4
10	0,81	43,1	53,5	7,0	8,7
13	0,84	43,5	51,8	9,4	11,2
16	1,32	60,9	46,0	11,8	8,9
21	1,96	74,4	38,0	17,2	8,8
24	2,07	89,0	43,0	18,1	8,8

5.2.1. Quantificação da Biomassa Aderida

De posse dos valores apresentados nas Tabelas 5.2 a 5.6, gráficos referentes à colonização das matrizes de espuma ao longo do tempo foram construídos. Em seguida foram propostos modelos matemáticos que representassem adequadamente os dados



experimentais (Figuras 5.4 a 5.8). Os valores dos parâmetros dos modelos ajustados para cada substrato estão apresentados nas Tabelas 5.7 a 5.11.

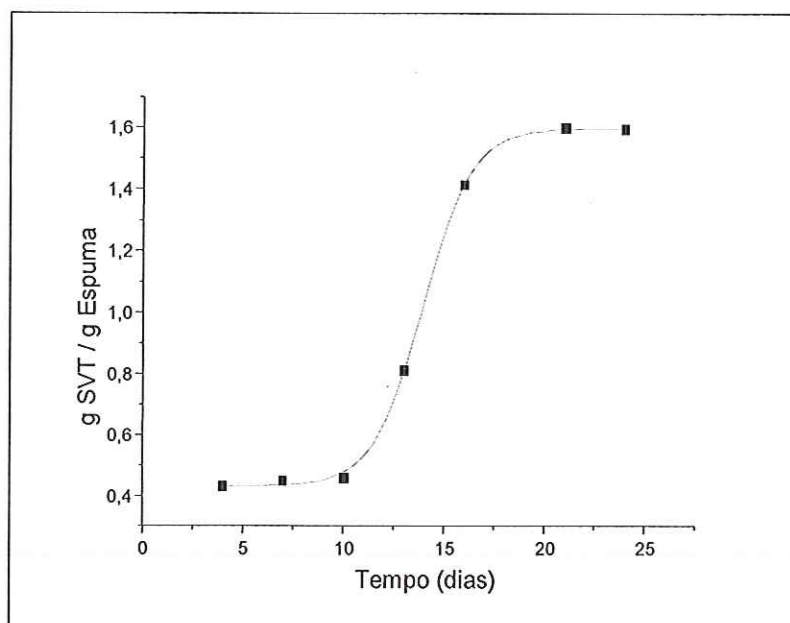


Figura 5.4: Massa de sólidos voláteis totais por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato. Valores experimentais (■) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.7: Valores dos parâmetros do modelo ajustado para a colonização das espumas utilizando glicose como substrato.

Modelo: Sigmoial(Boltzman)		
$y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x0)/dx))$		
$R^2 = 0,99967$		
Parâmetro	Valor	Erro
A1	0,43153	0,00915
A2	1,59664	0,01018
x0	13,91527	0,0715
dx	1,22658	0,05812

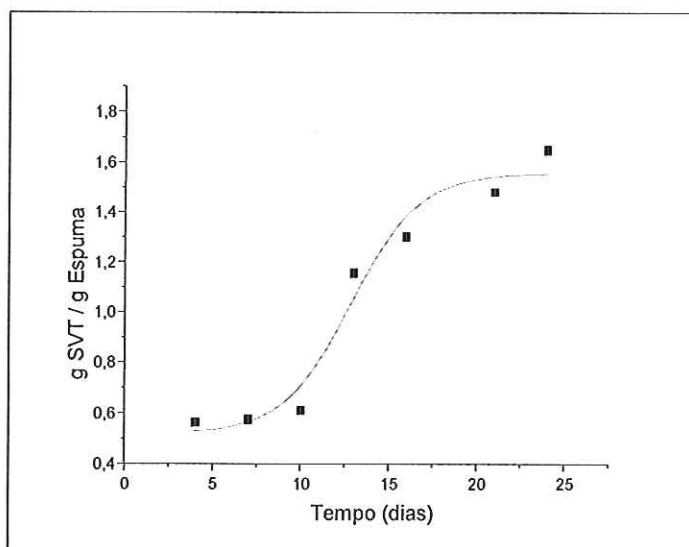


Figura 5.5: Massa de sólidos voláteis totais por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato. Valores experimentais (■) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.8: Valores dos parâmetros do modelo ajustado para a colonização das espumas utilizando amido como substrato.

Modelo: Sigmoideal(Boltzman)

$$y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x0)/dx))$$

$$R^2 = 0,96758$$

Parâmetro	Valor	Erro
A1	0,51674	0,112
A2	1,5586	0,0920
x0	12,887	0,956
dx	1,9306	0,898

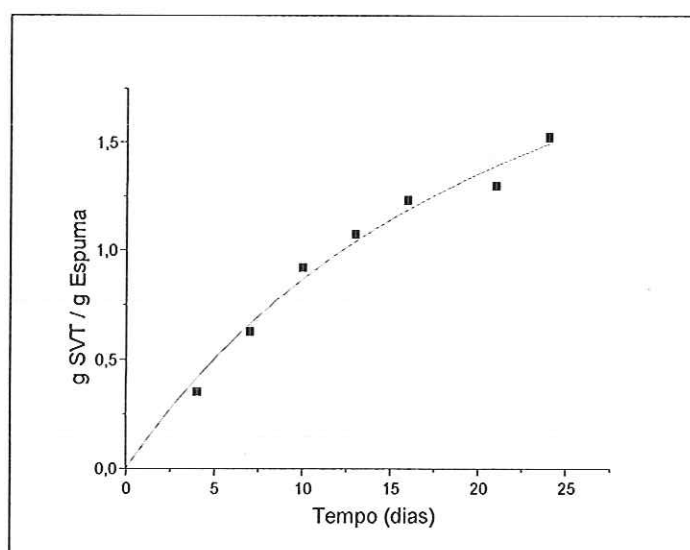


Figura 5.6: Massa de sólidos voláteis totais por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato. Valores experimentais (■) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.9: Valores dos parâmetros do modelo ajustado para a colonização das espumas utilizando óleo de soja como substrato.

Modelo: Hiperbólico		
$y = P1*x/(P2 + x)$		
$R^2 = 0,98874$		
Parâmetro	Valor	Erro
P1	3,09456	0,44589
P2	25,74704	6,07747

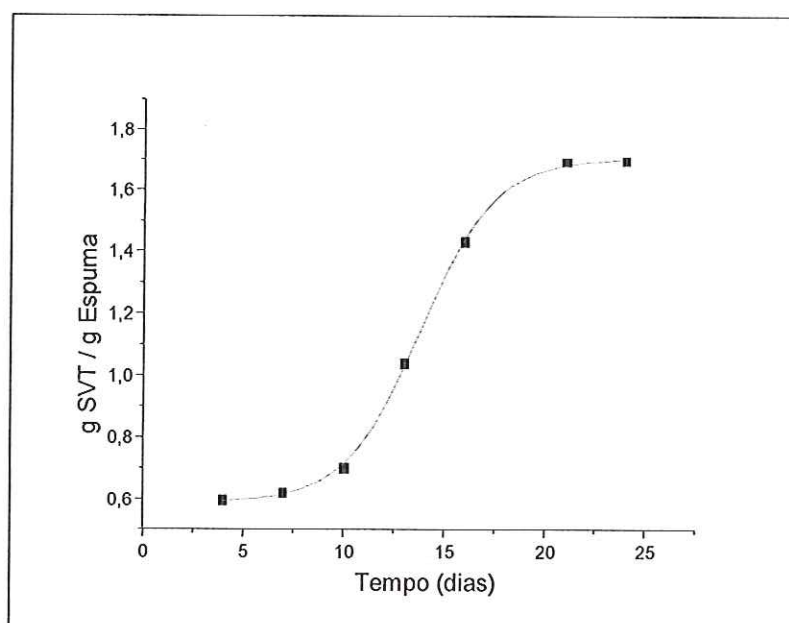


Figura 5.7: Massa de sólidos voláteis totais por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato. Valores experimentais (■) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.10: Valores dos parâmetros do modelo ajustado para a colonização das espumas utilizando extrato de carne como substrato.

Modelo: Sigmoideal(Boltzman)		
$y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x0)/dx))$		
$R^2 = 0,99961$		
Parâmetro	Valor	Erro
A1	0,58696	0,0114
A2	1,7052	0,0111
x0	13,803	0,0990
dx	1,8667	0,0940

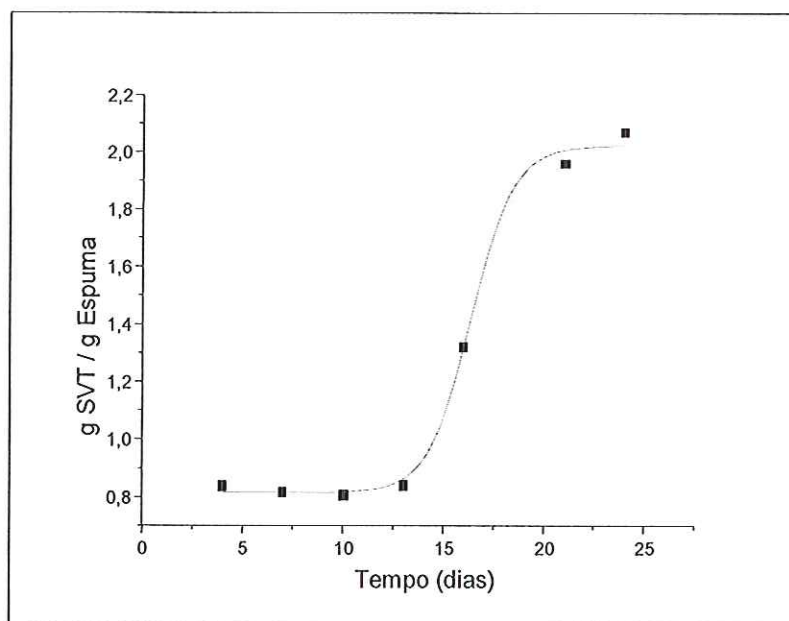


Figura 5.8: Massa de sólidos voláteis totais por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. Valores experimentais (■) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.11: Valores dos parâmetros do modelo ajustado para a colonização das espumas utilizando esgoto sintético como substrato.

Modelo: Sigmoideal(Boltzman)

$$y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x0)/dx))$$

$$R^2 = 0,99691$$

Parâmetro	Valor	Erro
A1	0,81374	0,0263
A2	2,0235	0,0353
x0	16,371	0,232
dx	1,0757	0,383

Os gráficos de crescimento de biomassa ao longo do tempo foram reunidos em um só (Figura 5.9) para uma melhor visualização da influência do substrato na colonização das matrizes de poliuretano.

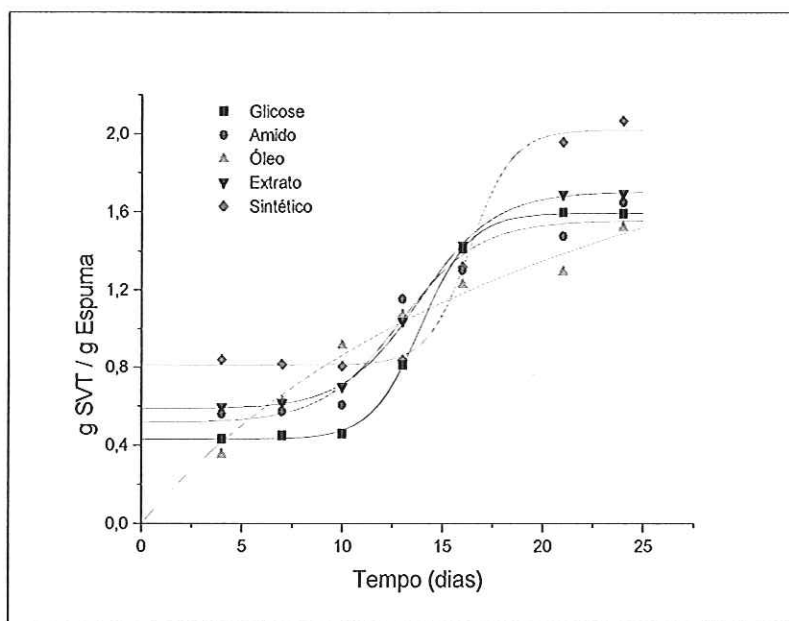


Figura 5.9: Massa de sólidos voláteis totais por grama de espuma, ao longo tempo, para os substratos utilizados.

De acordo com a Figura 5.9 e segundo os modelos ajustados, pode-se observar que o crescimento da biomassa para os ciclos utilizando glicose, amido, extrato de carne e esgoto sintético como substrato apresentaram comportamentos semelhantes podendo ser descritos segundo um modelo sigmoidal. Segundo este modelo, há uma fase inicial onde a quantidade de biomassa retida na espuma permanece praticamente constante. Em seguida, há um grande aumento desta biomassa e, finalmente, o modelo aponta para a estabilização da biomassa presente nas matrizes de espuma.

Por sua vez, quando se utilizou óleo de soja na alimentação dos reatores o modelo que melhor se ajustou aos pontos experimentais foi o hiperbólico, evidenciando um comportamento diferenciado no processo de inicial de aderência com aumento gradual da biomassa aderida na espuma. Este comportamento pode estar ligado a adsorção de moléculas de óleo, formando um filme condicionante, alterando assim as características do material de suporte e por conseguinte alterando o processo de aderência inicial dos microorganismos.

Pode-se observar, também, que quando foi utilizada uma única fonte de carbono na alimentação dos reatores (glicose, amido, óleo de soja e extrato de carne), todos os modelos ajustados para os respectivos ciclos, a partir do 24º dia, tendem para uma faixa estreita de valores de biomassa aderida (de 1,52 a 1,69 SVT/Espuma), apresentando a partir deste dia um comportamento semelhante. No entanto, quando se utilizou uma fonte complexa de carbono, o esgoto sintético, verificou-se uma maior quantidade de biomassa aderida às matrizes de poliuretano que nos demais ciclos (2,07 SVT/Espuma no 24º dia). A diversidade de substratos parece ter contribuído para a aderência de maior quantidade de biomassa.

As expressões obtidas a partir dos modelos matemáticos, relacionando STV por massa de suporte, foram derivadas a fim de se construir um gráfico de variação da velocidade de colonização das espumas com o tempo para os diversos substratos (Figura 5.10). Em seguida, os valores de velocidade máxima de colonização para cada substrato foram encontradas. As derivadas das expressões foram então integradas para se obter as concentrações médias ao longo dos ciclos. Em seguida, dividiu-se o valor de concentração médio pelo intervalo de tempo entre a primeira amostragem (4º dia) e a última (24º dia) obtendo-se assim, os valores de velocidade de colonização média para os respectivos substratos. Não foi utilizado o tempo total de ciclo na integração pois o modelo era válido apenas para o intervalo de tempo citado. Os valores de velocidade máxima e velocidade média de colonização são apresentados na Tabela 5.12 e a variação da velocidade de colonização para os diversos substratos está apresentada na Figura 5.10.

Tabela 5.12: Dados referentes à velocidade média e máxima de crescimento da biomassa para os diversos substratos.

Substrato	$V_{média}$ (g SVT/g Espuma.dia)	$V_{máxima}$ (g SVT/g Espuma.dia)	Dia* ($V_{máxima}$)
Glicose	0,058	0,24	14
Amido	0,051	0,13	13
Óleo de soja	0,054	0,09	4
Extrato de carne	0,055	0,15	14
Esgoto sintético	0,060	0,28	17

*Dia de ocorrência da velocidade máxima de colonização.

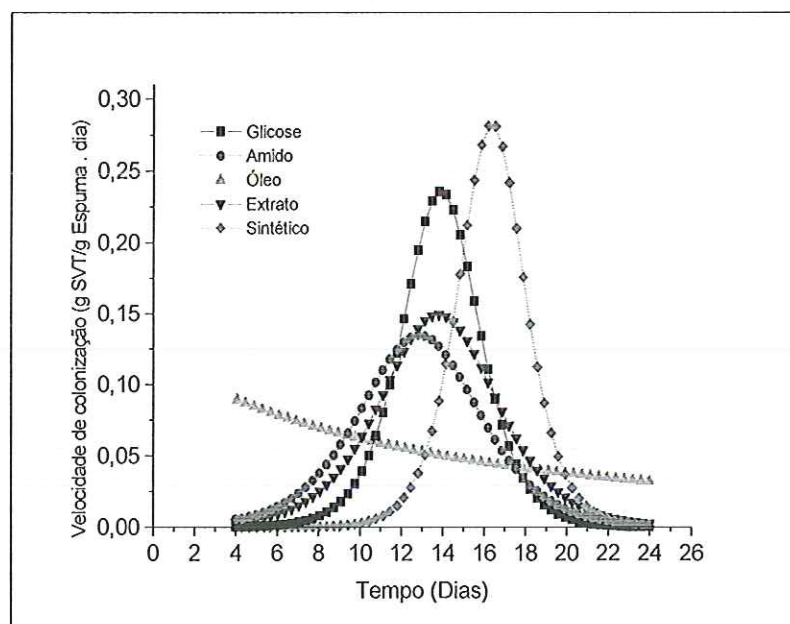


Figura 5.10: Variação da velocidade de colonização da espuma de poliuretano para os substratos utilizados.

De acordo com a Figura 5.10 e com os valores apresentados na Tabela 5.12, verificou-se que as velocidades médias de colonização obtidas foram muito próximas, não sofrendo grande influência da composição do substrato. Foi observado um valor médio de velocidade de colonização de $0,056 \pm 0,004$ g SVT/g Espuma.dia para todos os casos estudados.

Já em relação à velocidade máxima de colonização, os ciclos podem ser agrupados em três grupos. O primeiro formado pelos ciclos alimentados com amido e extrato de carne, os quais apresentaram valores semelhantes de velocidade máxima de colonização, ocorrendo em dias próximos. Pode-se também agrupar os ciclos alimentados com glicose e com esgoto sintético que, da mesma forma, apresentaram valores muito parecidos com ocorrência em dias próximos. A alta velocidade máxima observada quando se utilizou glicose como fonte de carbono pode estar relacionada com a facilidade de degradação deste substrato, enquanto que a alta velocidade de colonização observada para o meio complexo está relacionada principalmente à diversidade de substratos oferecidos à biomassa.

Já o ciclo utilizando o óleo de soja apresentou comportamento bem distinto, com velocidade máxima de colonização baixa, ocorrendo no 4º dia do ciclo e decrescendo sempre até o final do experimento. Como já foi mencionado anteriormente, este comportamento pode estar ligado a adsorção de moléculas de óleo na partícula, que por sua vez pode alterar o fenômeno de aderência inicial.

5.2.2. Quantificação dos Polímeros Extracelulares em Relação à Biomassa Aderida

De maneira análoga ao procedimento utilizado para quantificação da biomassa aderida às espumas, foram construídos gráficos referentes à excreção de polímeros na forma de carboidratos e proteínas. Foram ajustadas expressões matemáticas, e em seguida estas expressões foram derivadas a fim de se obter as velocidades máximas e mínimas de excreção de polímeros para cada substrato. Os gráficos de excreção de polímeros na forma de carboidratos, na forma de proteínas e de velocidade de excreção ao longo do tempo estão representados pelas Figuras 5.11 a 5.25. Os valores dos parâmetros dos modelos ajustados para cada substrato estão apresentados nas Tabelas 5.13 a 5.22.

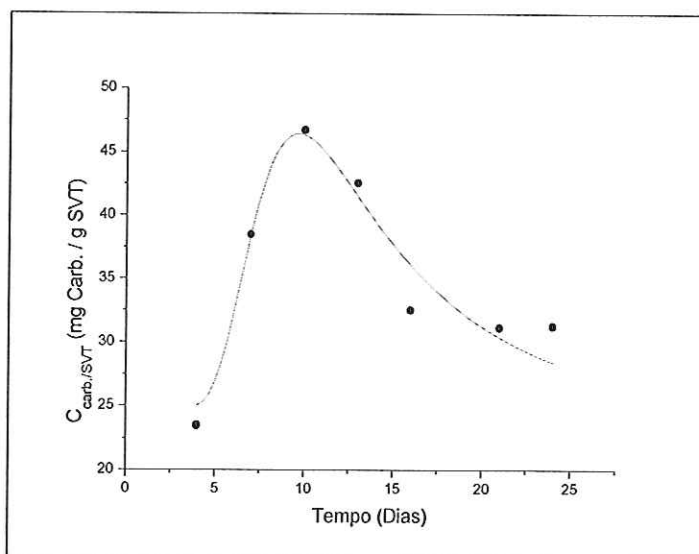


Figura 5.11: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato. Valores experimentais (•) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.13: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando glicose como substrato.

Modelo: Pulso

$$y = y_0 + A * (1 - \exp(-(x-x_0)/t_1))^P * \exp(-(x-x_0)/t_2)$$

$R^2 = 0,93304$

Parâmetro	Valor	Erro
y_0	24.75719	*0
x_0	-34.73393	*0
A	15435.55476	*0
t_1	1.84048	0.01045
P	7692546117.69616	*0

* Estes parâmetros foram fixados para que a função convergisse.

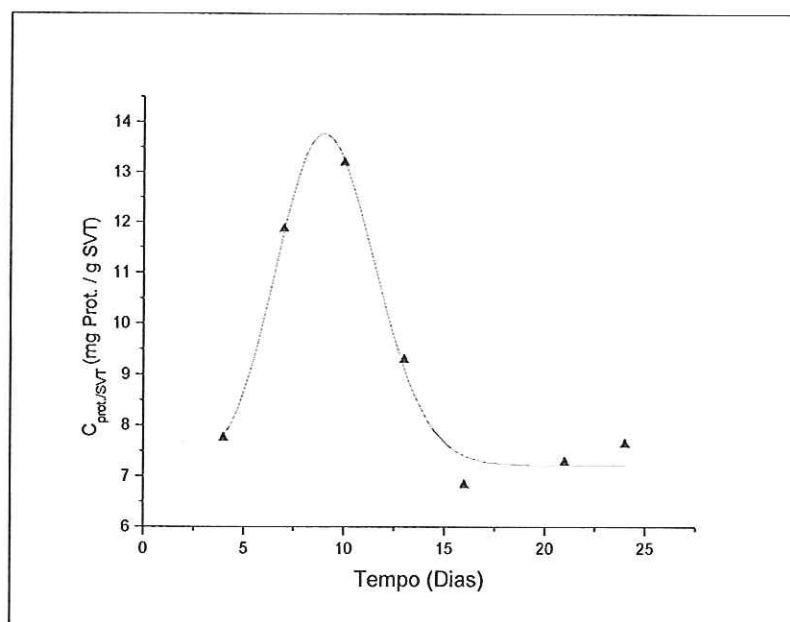


Figura 5.12: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo do tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato. Valores experimentais (\blacktriangle) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.14: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando glicose como substrato.

Modelo: Pulso

$$y = y_0 + A \cdot (1 - \exp(-(x - x_0)/t_1))^P \cdot \exp(-(x - x_0)/t_2)$$

$$R^2 = 0,98501$$

Parâmetro	Valor	Erro
y ₀	7,22175	0,5311
x ₀	-22,09143	2949,9353
A	2,1729E52	1,2558E56
t ₁	17,77712	2988,75746
P	211,94108	67434,6362

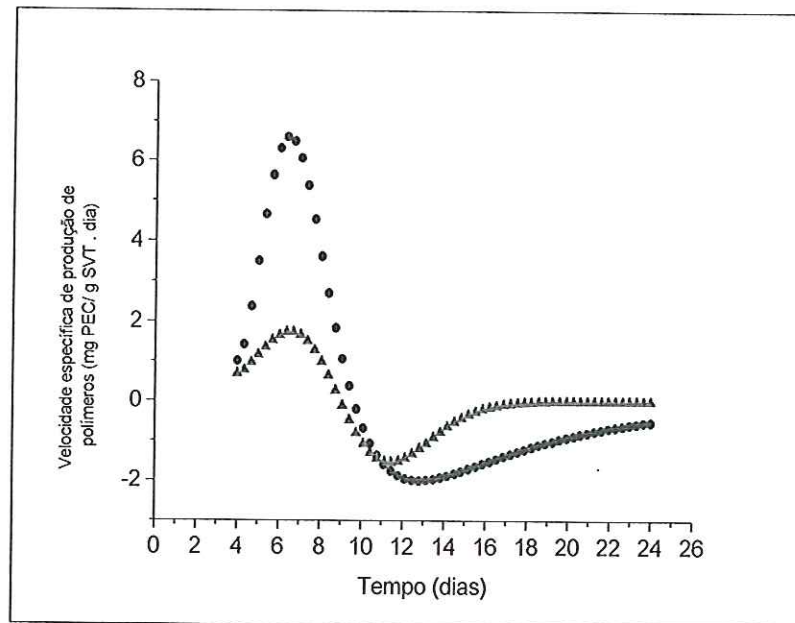


Figura 5.13: Velocidade específica de produção de polímeros (● carboidratos; ▲ proteínas), ao longo tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato.

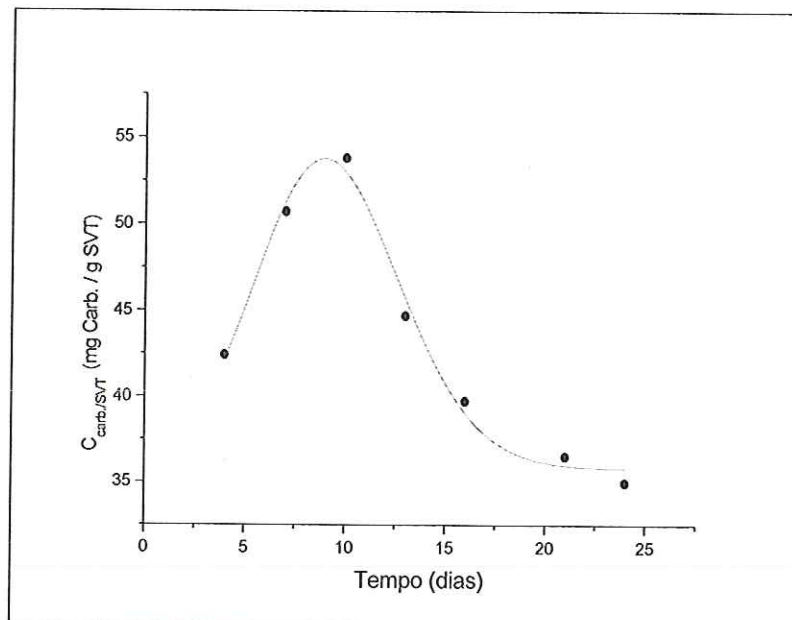


Figura 5.14: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato. Valores experimentais (●) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.15: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis, ao longo do ciclo, utilizando amido como substrato.

Modelo: Pulso		
$y = y_0 + A \cdot (1 - \exp(-(x-x_0)/t_1))^P \cdot \exp(-(x-x_0)/t_2)$		
$R^2 = 0,98818$		
Parâmetro	Valor	Erro
y0	35,8007	1,76214
x0	-70,20249	55772,43014
A	1,2509E58	8,6928E62
t1	17,51411	1331,74845
P	2152,45938	7434733,71892

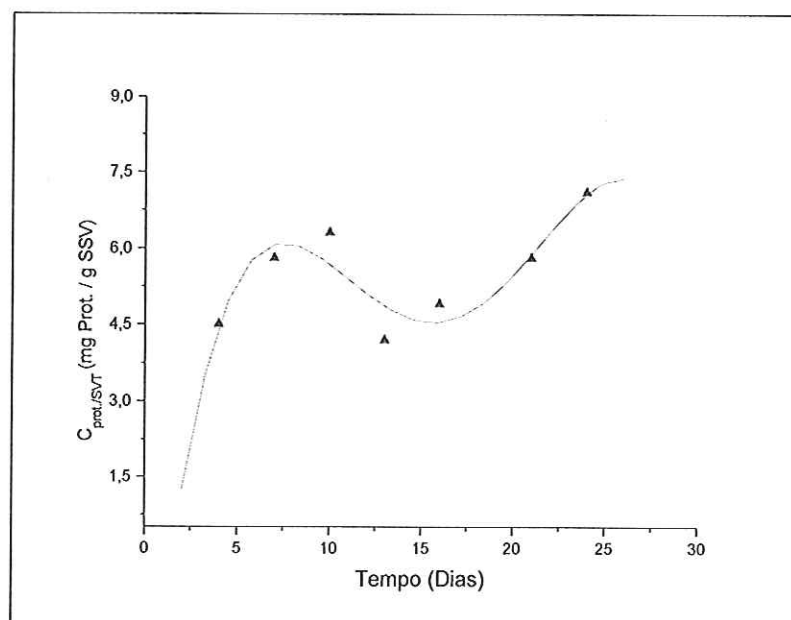


Figura 5.15: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato. Valores experimentais (▲) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.16: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando amido como substrato.

Modelo: Regressão Polinomial		
$Y = A + B1 \cdot X + B2 \cdot X^2 + B3 \cdot X^3 + B4 \cdot X^4$		
$R^2 = 0,84176$		
Parâmetro	Valor	Erro
A	-4,63597	5,4636
B1	3,72603	2,16645
B2	-0,43883	0,2799
B3	0,02002	0,01448
B4	-3,06489E-4	2,58984E-4

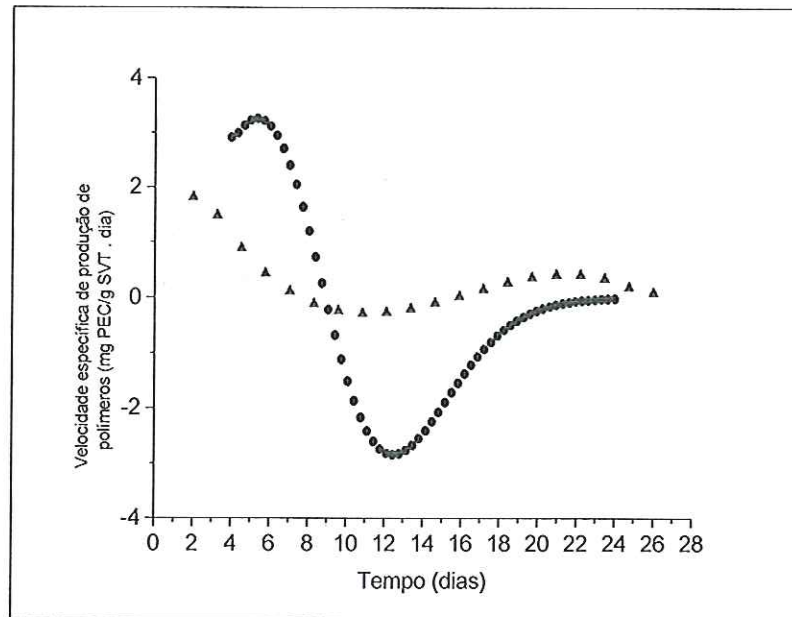


Figura 5.16: Velocidade específica de produção de polímeros (● carboidratos; ▲ proteínas), ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato.

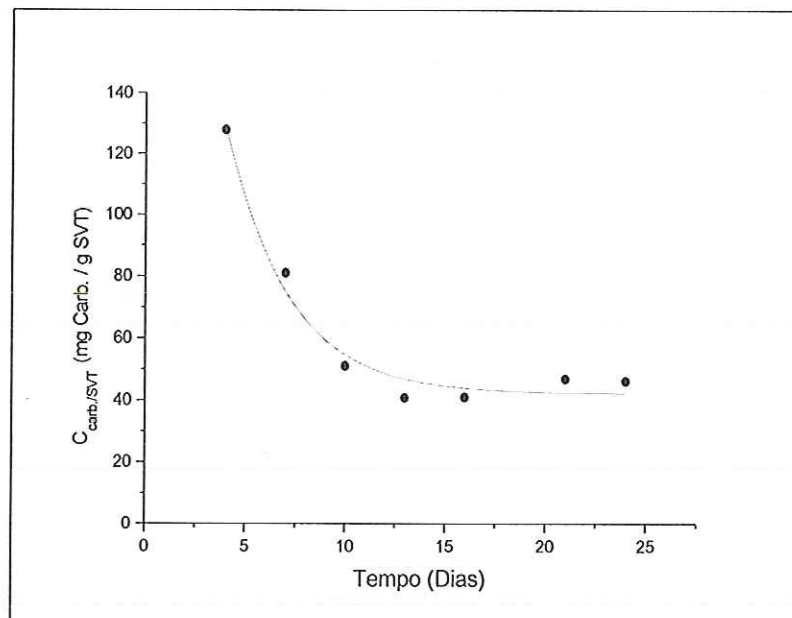


Figura 5.17: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato. Valores experimentais (●) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.17: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando óleo de soja como substrato.

Modelo: Decaimento Exponencial		
$y = A1 * \exp(-x/t1) + y0$		
$R^2 = 0,97922$		
Parâmetro	Valor	Erro
y0	42.22914	3.40071
A1	315.71635	77.2423
t1	3.1017	0.57313

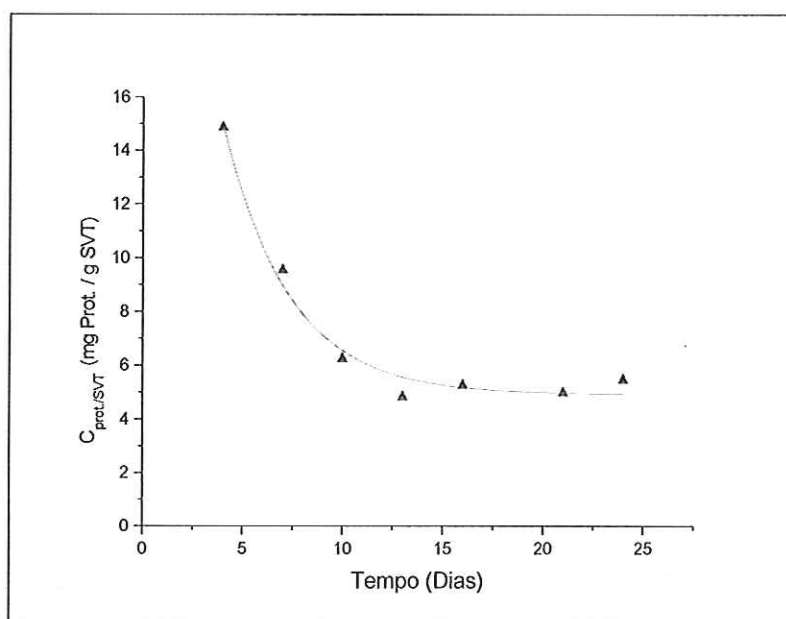


Figura 5.18: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo do tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato. Valores experimentais (▲) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.18: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando óleo de soja como substrato.

Modelo: Decaimento Exponencial		
$y = A1 * \exp(-x/t1) + y0$		
$R^2 = 0,98467$		
Parâmetro	Valor	Erro
y0	4,93149	0,34836
A1	33,86647	6,64729
t1	3,29866	0,51864

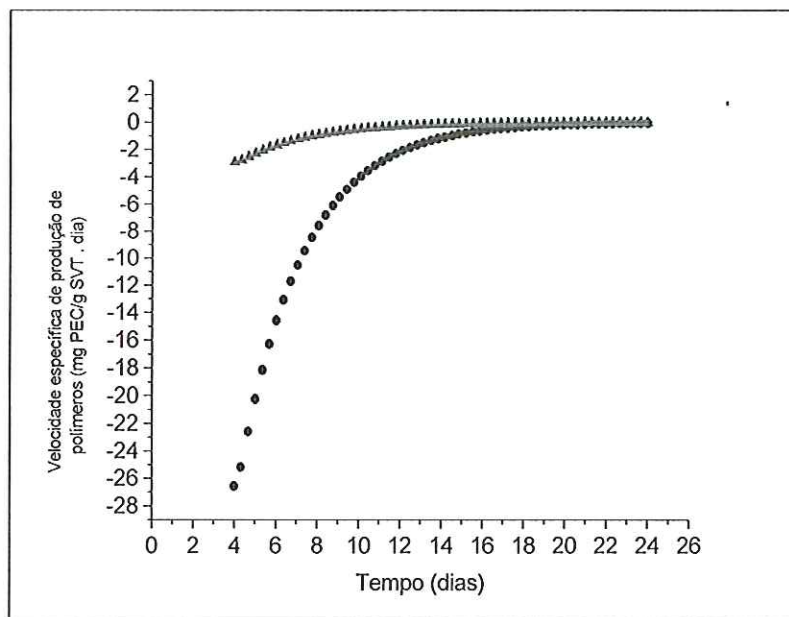


Figura 5.19: Velocidade específica de produção de polímeros (● carboidratos; ▲ proteínas), ao longo tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato.

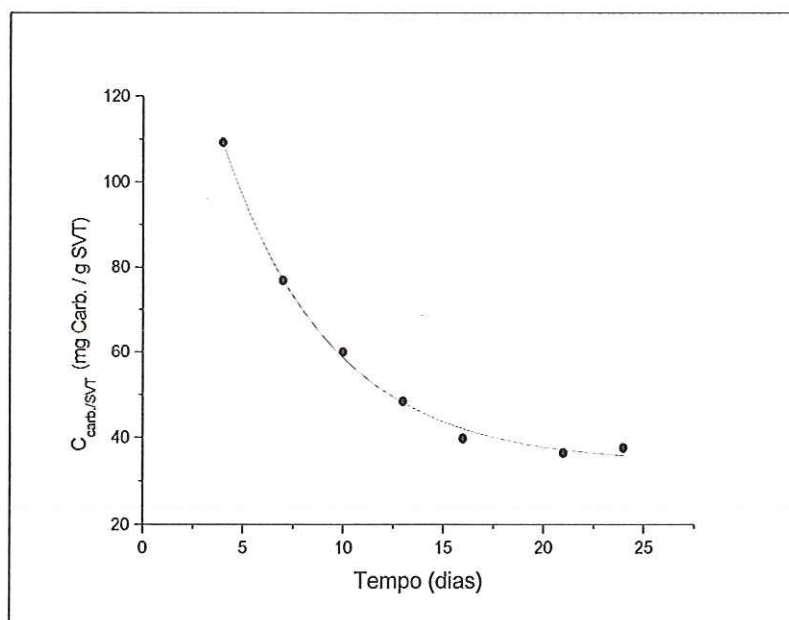


Figura 5.20: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato. Valores experimentais (●) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.19: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando extrato de carne como substrato.

Modelo: Decaimento Exponencial		
$y = A1 * \exp(x_0 - x/t1) + y_0$		
$R^2 = 0,99737$		
Parâmetro	Valor	Erro
y0	33,98058	1,78366
x0	0,53296	19303790,4833
A1	143,42945	514202172,99609
t1	5,38452	0,42954

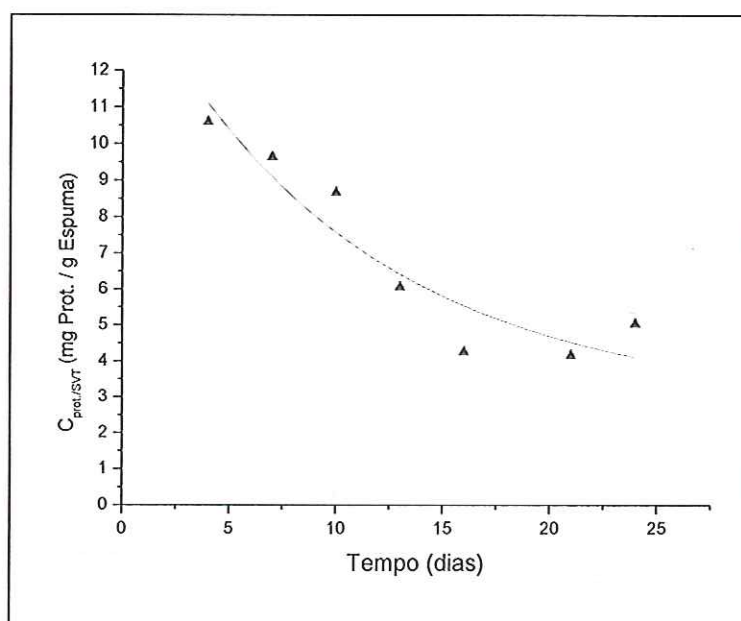


Figura 5.21: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato. Valores experimentais (▲) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.20: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando extrato de carne como substrato.

Modelo: Decaimento Exponencial		
$y = A1 * \exp(x_0 - x/t1) + y_0$		
$R^2 = 0,89508$		
Parâmetro	Valor	Erro
y0	2,81401	3,0818
x0	-1,90632	248450670,42533
A1	14,34504	329988827,60534
t1	10,80047	8,71657

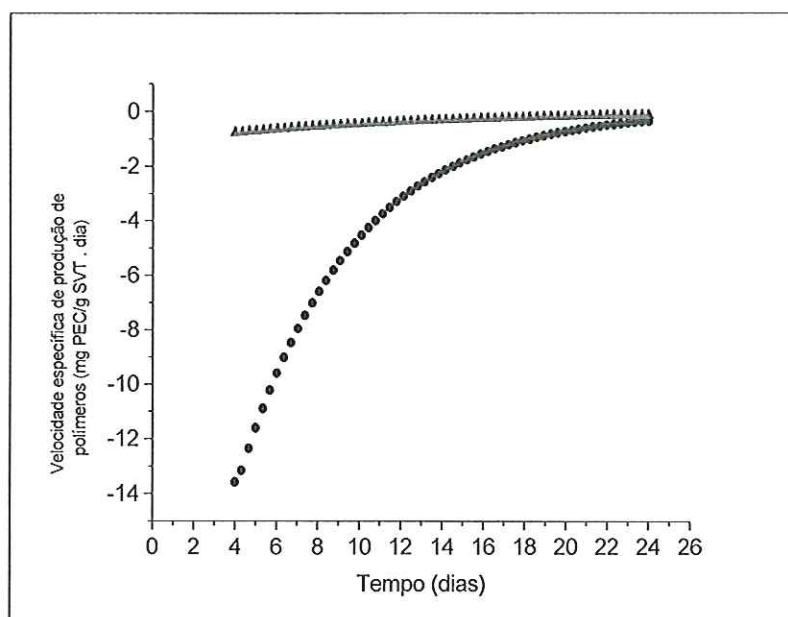


Figura 5.22: Velocidade específica de produção de polímeros (● carboidratos; ▲ proteínas), ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato.

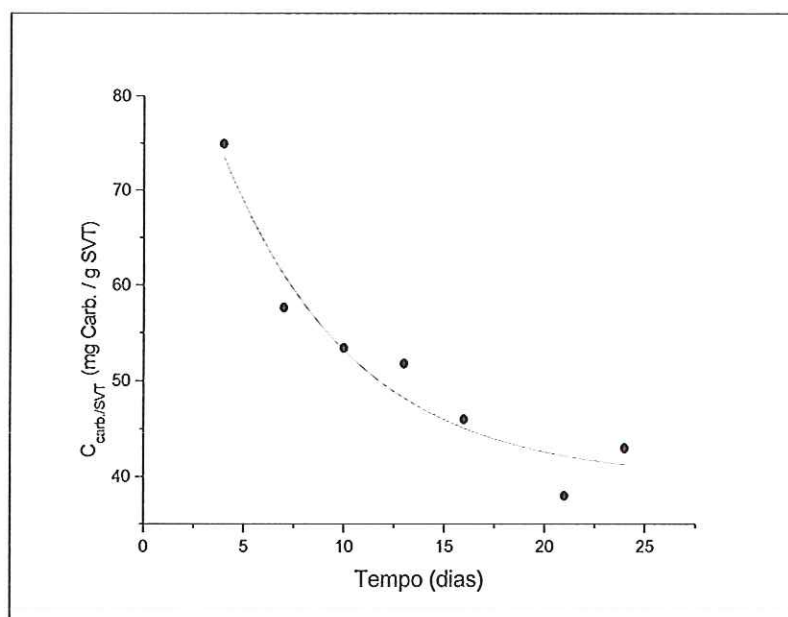


Figura 5.23: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. Valores experimentais (●) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.21: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato.

Modelo: Decaimento Exponencial		
$y = A1 * \exp(x_0 - x/t1) + y_0$		
$R^2 = 0,94496$		
Parâmetro	Valor	Erro
y0	39.71209	4.62786
x0	2.56124	34065174.13973
A1	42.28466	220684848.78338
t1	6.52711	2.65768

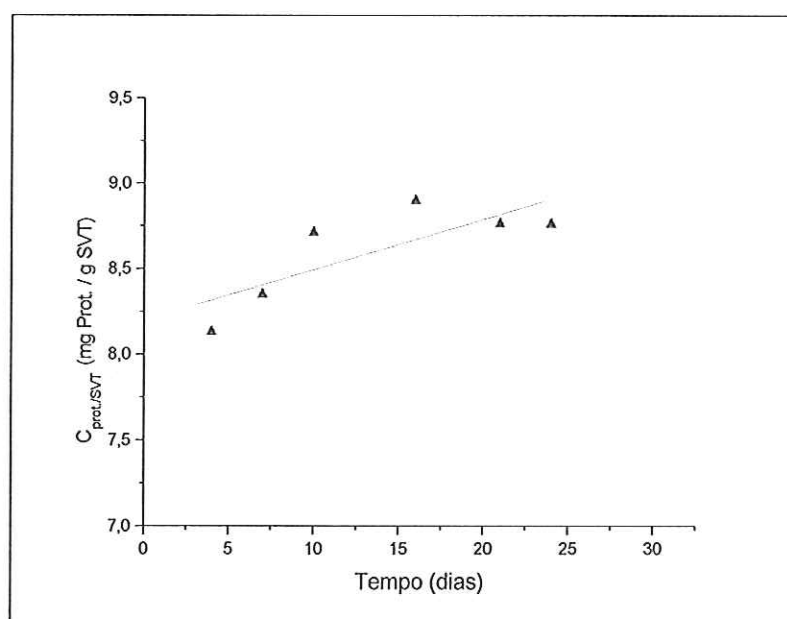


Figura 5.24: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. Valores experimentais (Δ) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.22: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis ao longo do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato.

Modelo: Regressão Linear		
$Y = A + B * X$		
$R^2 = 0,79413$		
Parâmetro	Valor	Erro
A	8,20144	0,17385
B	0,02935	0,01123

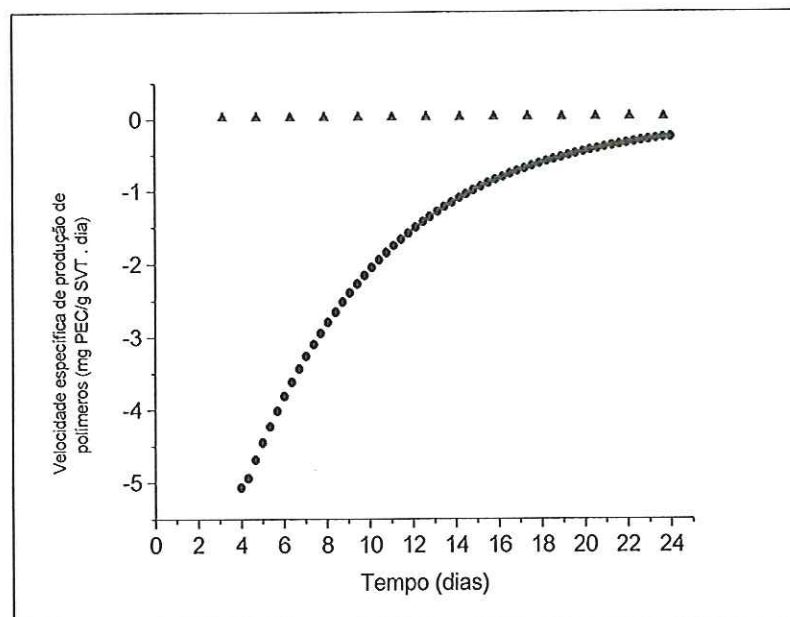


Figura 5.25: Velocidade específica de produção de polímeros (● carboidratos; ▲ proteínas), ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato.

Velocidades específicas de produção de polímeros positivas indicam maior produção de polímeros em relação à quantidade de biomassa aderida à espuma de poliuretano, enquanto que velocidades negativas indicam predominância de aderência em relação à produção de polímeros. Velocidades nulas indicam equilíbrio entre aderência e produção de polímeros.

Os valores de excreção de polímeros na forma de carboidratos e proteínas foram reunidos em dois gráficos respectivamente para a melhor visualização da influência do substrato em tal processo. Estes gráficos são apresentados pelas Figuras 5.26 e 5.27.

De acordo com as Figuras 5.26 e 5.27 pode-se constatar que os ciclos alimentados com amido e glicose (polissacarídeos) apresentaram comportamento semelhante para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos e polipeptídios). Da mesma forma, os ciclos alimentados com óleo de soja e extrato de carne (constituídos por moléculas maiores) podem ser agrupados de acordo com seu comportamento, o qual segue um modelo de decaimento exponencial. O ciclo alimentado com esgoto sintético, apesar de também poder ser descrito segundo modelo de decaimento exponencial no caso de polímeros na forma de carboidratos, parece ser a somatória dos outros quatro ciclos, os quais são alimentados com substratos constituintes do esgoto sintético. Os polímeros na forma de polipeptídios apresentaram valores constantes ao longo do ciclo alimentado com esgoto sintético.

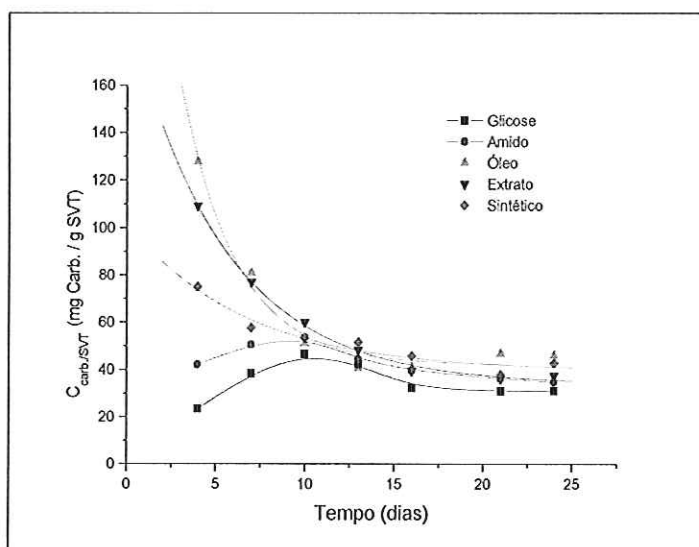


Figura 5.26: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para os substratos utilizados.

O fenômeno de excreção de polímeros na forma de polissacarídeos parece sofrer grande influência do substrato utilizado na etapa de aderência inicial (até o 10º dia). Entretanto, após essa fase inicial, a excreção dos polímeros se dá de maneira independente do substrato utilizado na alimentação dos reatores, pois, de acordo com a Figura 5.26, a produção específica de polímeros se estabiliza em uma faixa muito estreita de concentração de polímeros, onde todos os ciclos apresentam comportamento semelhante.

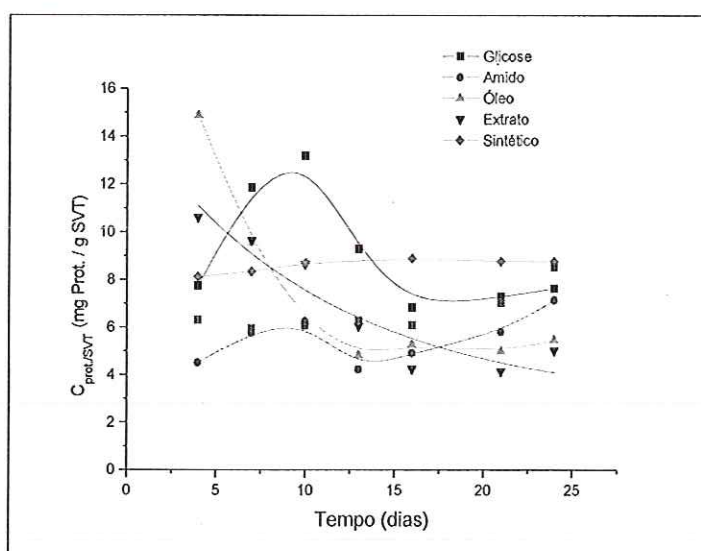


Figura 5.27: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de sólidos voláteis totais, ao longo tempo, para os substratos utilizados.

A excreção de polímeros na forma de polipeptídios também parece sofrer grande influência do substrato utilizado apenas na etapa de aderência inicial (Figura 5.27).

Os ciclos alimentados com glicose e amido apresentaram, em uma primeira fase até por volta do 10º dia, um crescente aumento na excreção de polímeros na forma de polissacarídeos e polipeptídios em relação à proporção de biomassa aderida. Isso pode ser devido a mudança na atividade metabólica dos microorganismos, quando há aumento na quantidade de polímero excretado visando possivelmente a aderência à superfície da espuma. Depois dessa fase há uma diminuição sensível da excreção de polissacarídeos tendendo ao final do ciclo para a estabilização da produção de polímeros em relação ao crescimento celular.

As velocidades específicas de produção de polímeros nos ensaios com glicose e amido aumentam continuamente até o sexto dia, a partir do qual há decréscimo na produção, atingindo a velocidade específica zero por volta do 10º dia. A velocidade específica atinge o valor zero quando há equilíbrio entre a produção de polímero e a aderência da biomassa no suporte, expressa como SVT. Após o 10º dia de operação, a aderência de biomassa passa a ser maior que a excreção de polímeros, resultando em velocidades específicas negativas, as quais tendem ao equilíbrio (zero) a partir do 14º dia de operação. Este comportamento é mais pronunciado no caso de polímeros na forma de carboidratos.

Os ciclos alimentados com óleo de soja e extrato de carne têm sua produção específica de polímeros na forma de polissacarídeos e polipeptídios podendo ser descrita de acordo com um modelo de decaimento exponencial, onde a velocidade máxima de produção de polímeros ocorre no início permitindo a aderência dos microorganismos às matrizes de poliuretano. Conseqüentemente, as velocidades específicas de produção de polímeros são sempre negativas, tendendo a zero (equilíbrio entre produção de polímeros e aderência da biomassa) no final do experimento. Este comportamento foi também observado no ensaio com água residuária complexa em relação aos polímeros na forma de carboidratos. No caso de polímeros na forma de polipeptídios, a velocidade específica apresentou valor nulo ao longo de todo o experimento com meio complexo.

A partir dos gráficos de velocidade específica de produção de polímeros foram obtidos os valores para a produção máxima e mínima de polímeros por grama de biomassa para cada substrato. Estes valores são apresentados na Tabela 5.23.

Velocidades específicas máximas apresentaram valores positivos apenas para os ensaios com glicose e amido, indicando maior produção de polímeros em relação à aderência no início do ciclo (entre 6º e 7º dias). Como discutido anteriormente, a liberação de polímeros no início do ciclo pode ser uma estratégia para a aderência inicial dos microorganismos no suporte. Nos ensaios com lipídeo, extrato de carne e água residuária complexa não foram observadas velocidades positivas, indicando que, em nenhum momento,

houve maior liberação de polímeros extracelulares em relação à aderência. Isso não quer dizer que não houve liberação para aderência inicial. O mais provável é que o pico de produção de polímeros tenha sido atingido antes do 4º dia de operação, ou seja, anterior ao monitoramento. Nesses casos, as velocidades máximas foram sempre observadas no final dos experimentos e as velocidades mínimas, no primeiro dia monitorado. No caso do ensaio com esgoto sintético a produção de polímeros como polipeptídios permaneceu constante, resultando em velocidades específicas nulas.

Tabela 5.23: Dados referentes à velocidade específica de produção de polímeros para os diversos substratos.

Substrato	Velocidade específica de produção de polímeros (mg PEC/g SVT * dia)							
	Mg Carboidrato (Lactose)/g SVT.dia				Mg Proteína (S.A.B.)/g SVT.dia			
	Máxima	Dia	Mínima	Dia	Máxima	Dia	Mínima	Dia
Glicose	6,6	7	-2,0	13	1,7	7	-1,5	12
Amido	3,3	6	-2,8	13	0,4	21	-2,8	11
Óleo de soja	0	24	-27	4	0	24	-2,9	4
Extrato de carne	-0,35	24	-14	4	-0,12	24	-0,76	4
Esgoto sintético	-0,25	24	-5,1	4	0	-	0	*

5.2.3. Quantificação dos Polímeros Extracelulares em Relação às Matrizes de Poliuretano

De maneira análoga ao procedimento utilizado para a determinação das velocidades máximas específicas de produção de polímeros, foram construídos gráficos referentes à excreção de polímeros na forma de carboidratos e proteínas por grama de espuma ao longo do tempo. Em seguida, foram ajustadas expressões matemáticas aos pontos experimentais. As expressões obtidas foram derivadas a fim de se obter as velocidades máximas e mínimas de excreção de polímeros por grama de espuma para cada substrato. Os gráficos são apresentados pelas Figuras 5.28 a 5.42.

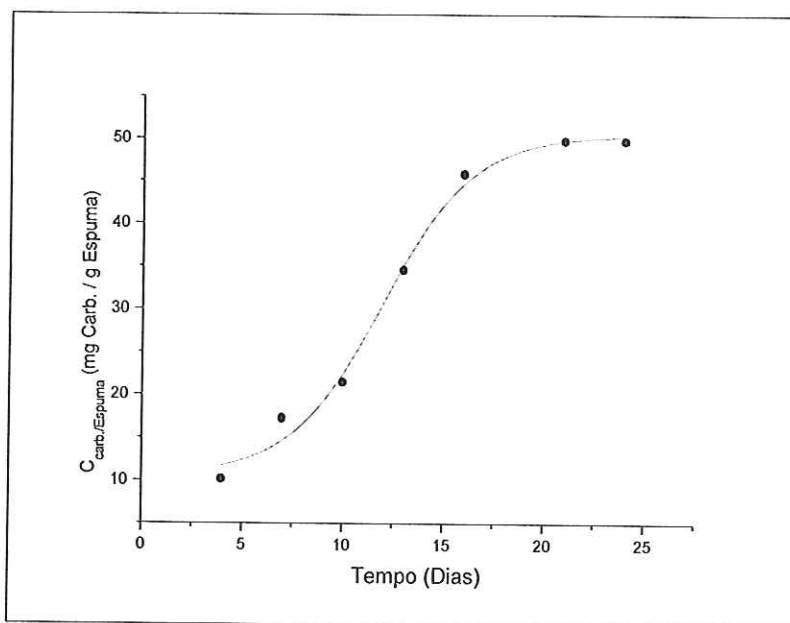


Figura 5.28: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato. Valores experimentais (•) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.24: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando glicose como substrato.

Modelo: Sigmoidal(Boltzman)		
$y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x0)/dx))$		
$R^2 = 0,99244$		
Parâmetro	Valor	Erro
A1	10,63444	2,59404
A2	50,5274	1,6539
x0	11,96231	0,54147
Dx	2,27644	0,5068

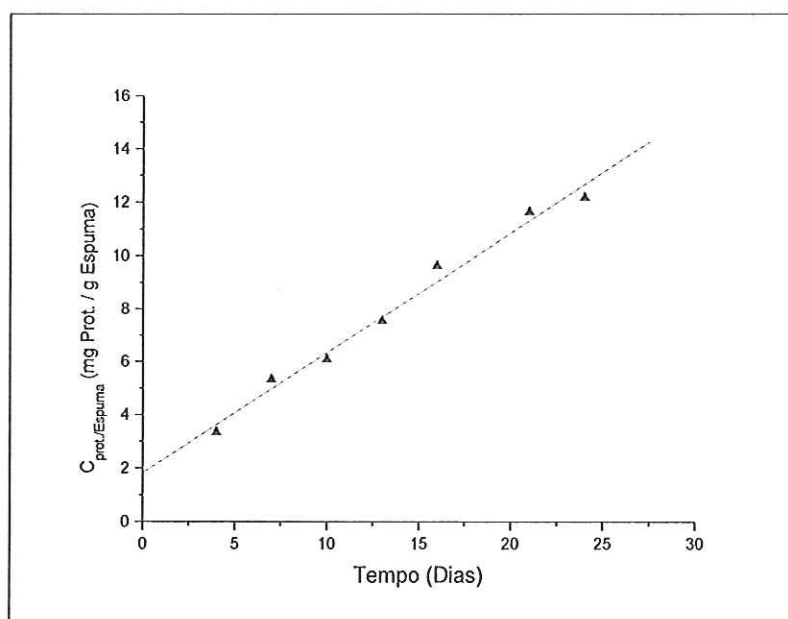


Figura 5.29: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato. Valores experimentais (▲) e modelo ajustado (---).

Tabela 5.25: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando glicose como substrato.

Modelo: Regressão Linear

$$Y = A + B * X$$

$$R^2 = 0,9924$$

Parâmetro	Valor	Erro
A	1,81828	0,38029
B	0,45265	0,0251

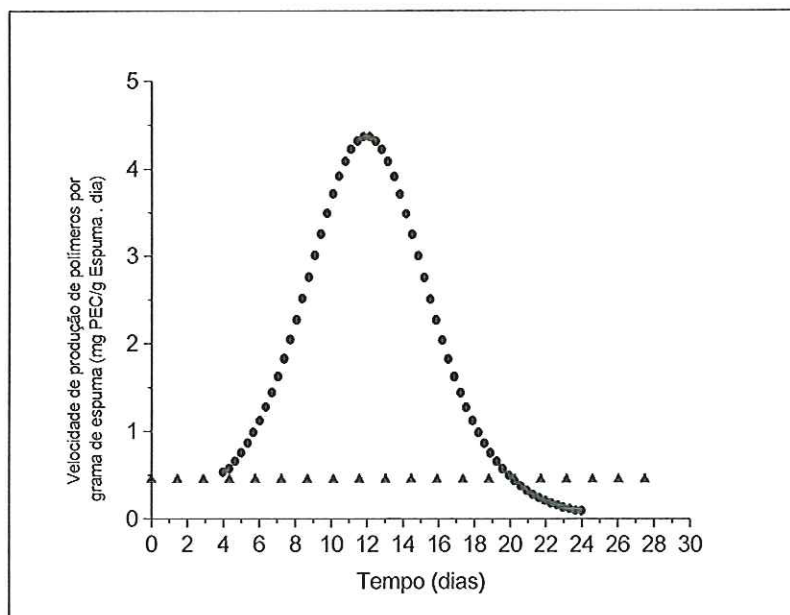


Figura 5.30: Velocidade de produção de polímeros (● carboidratos; ▲ proteínas), por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato.

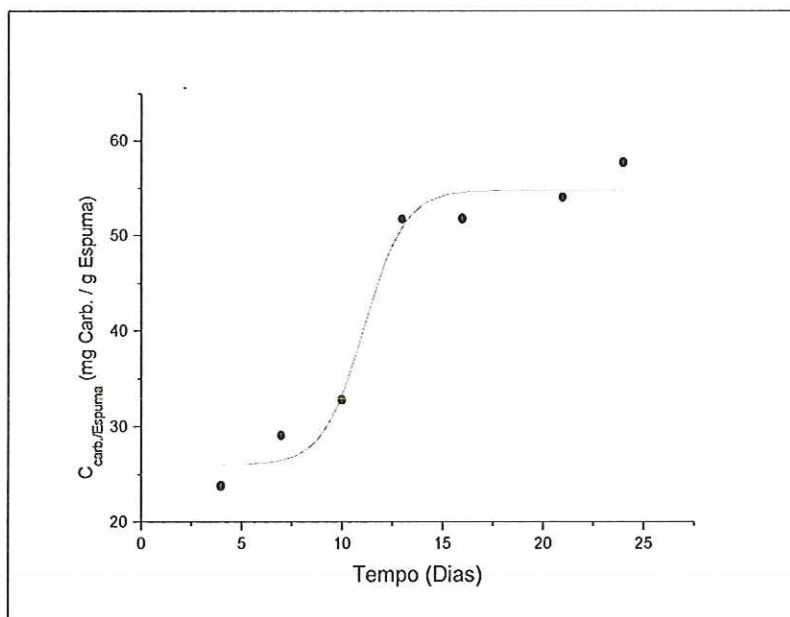


Figura 5.31: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato. Valores experimentais (●) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.26: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando amido como substrato.

Modelo: Sigmoidal(Boltzman)		
$y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x0)/dx))$		
$R^2 = 0,97484$		
Parâmetro	Valor	Erro
A1	26,00947	2,40497
A2	54,79218	1,87309
x0	11,09159	0,61625
Dx	1,01863	0,42686

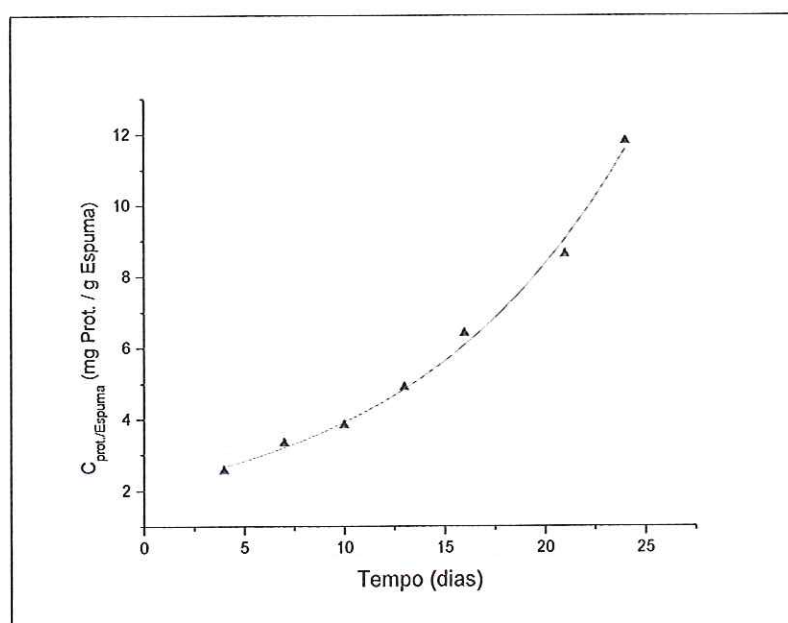


Figura 5.32: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato. Valores experimentais (\blacktriangle) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.27: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando amido como substrato.

Modelo: Crescimento Exponencial		
$y = A1 * \exp(x-x_0 / t1) + y0$		
$R^2 = 0,99423$		
Parâmetro	Valor	Erro
y0	0.9345	0.97619
x0	-12.11064	--
A1	0.40026	--
t1	10.99899	2.1899

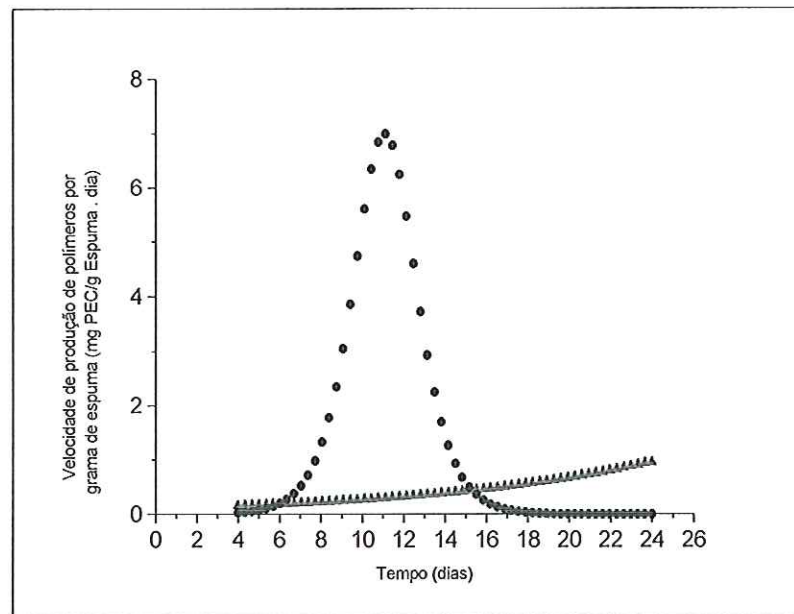


Figura 5.33: Velocidade de produção de polímeros (● carboidratos; ▲ proteínas), por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato.

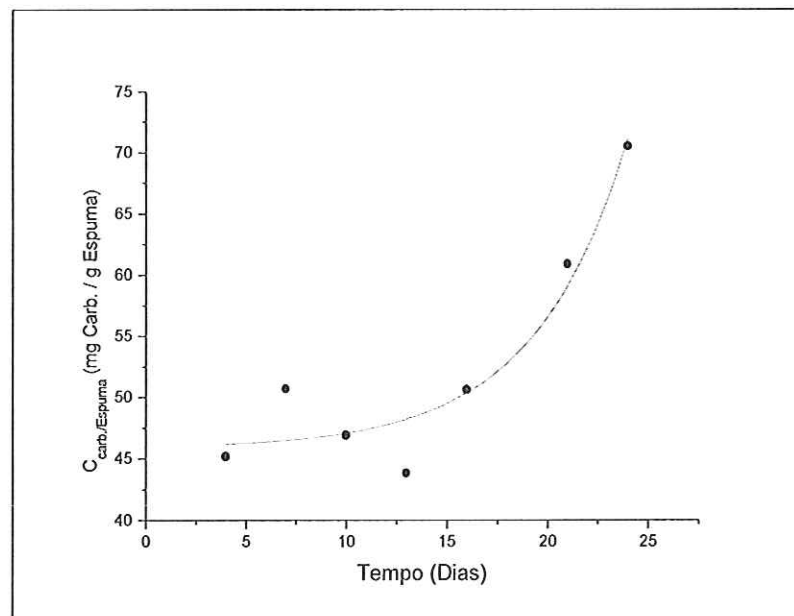


Figura 5.34: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato. Valores experimentais (●) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.28: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando óleo de soja como substrato.

Modelo: Crescimento Exponencial

$$y = A1 * \exp(x - x_0 / t1) + y_0$$

$$R^2 = 0,92563$$

Parâmetro	Valor	Erro
y0	44.15274	*0
x0	3.08531	0.08524
A1	0.83798	*0
t1	6.05227	*0

* Estes parâmetros foram fixados para que a função convergisse.

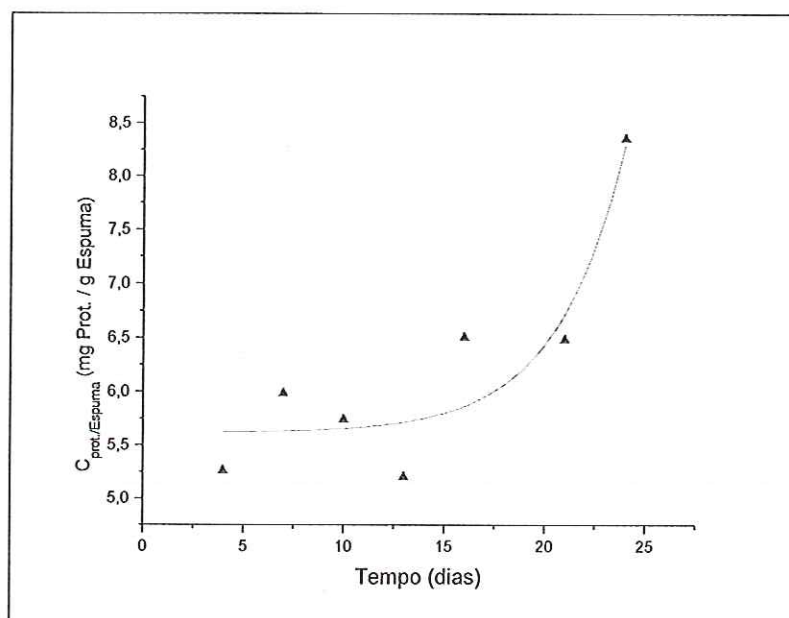


Figura 5.35: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato. Valores experimentais (\blacktriangle) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.29: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando óleo de soja como substrato.

Modelo: Crescimento Exponencial

$$y = A1 * \exp(x - x_0 / t1) + y_0$$

$$R^2 = 0,85737$$

Parâmetro	Valor	Erro
y0	5,6159	0,28951
A1	0,00218	0,00884
t1	3,37283	1,91999

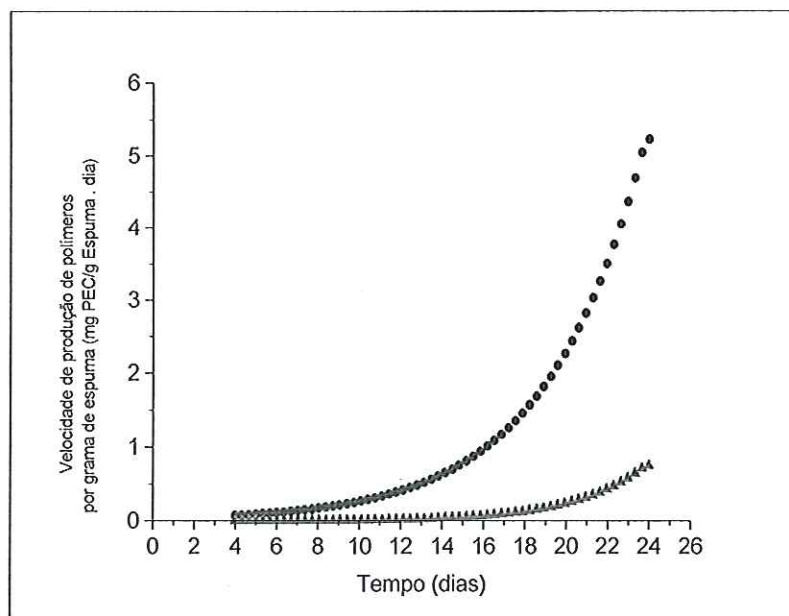


Figura 5.36: Velocidade de produção de polímeros (● carboidratos; ▲ proteínas), por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando óleo como substrato.

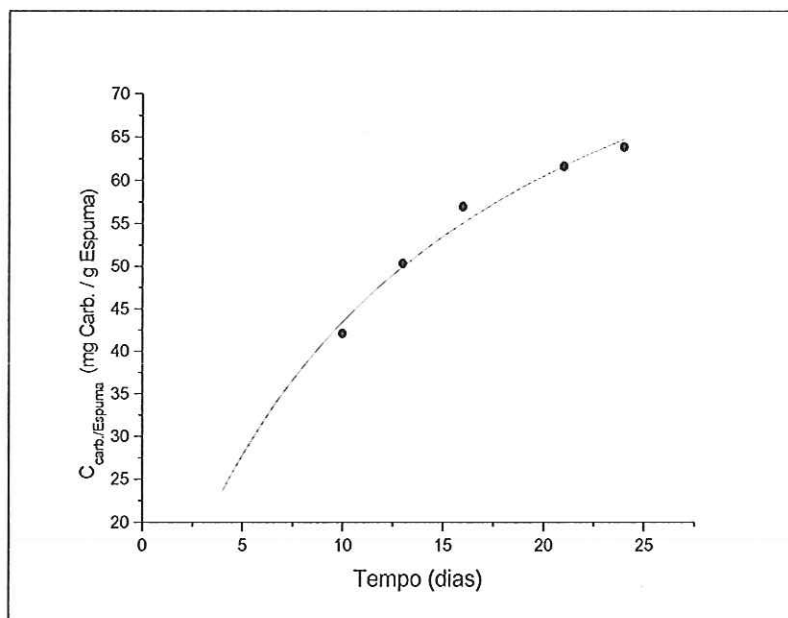


Figura 5.37: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato. Valores experimentais (●) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.30: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando extrato de carne como substrato.

Modelo: Hiperbólico		
$y = P1 * x / (P2 + x)$		
$R^2 = 0,97991$		
Parâmetro	Valor	Erro
P1	99,47882	6,87085
P2	12,88268	2,05767

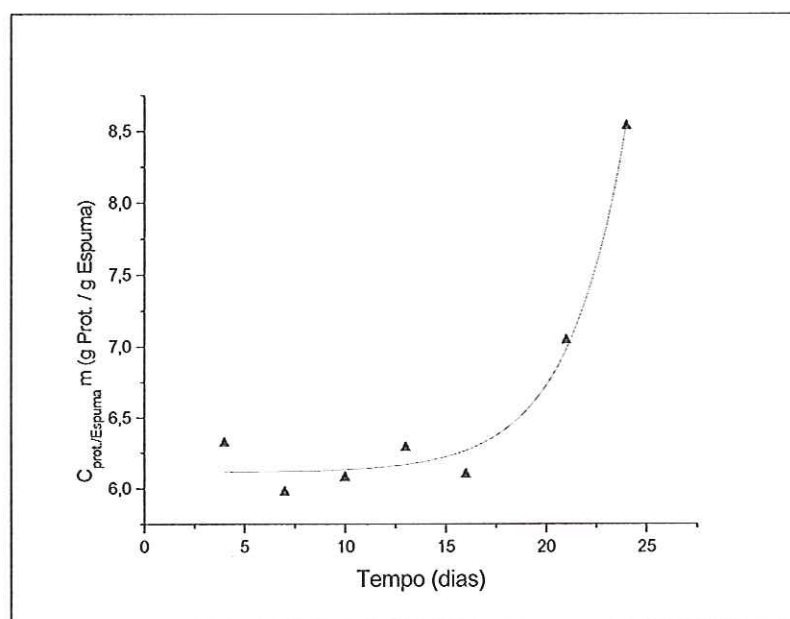


Figura 5.38: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato. Valores experimentais (\blacktriangle) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.31: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando extrato de carne como substrato.

Modelo: Crescimento Exponencial		
$y = A1 * \exp(x - x_0 / t1) + y_0$		
$R^2 = 0,97736$		
Parâmetro	Valor	Erro
y_0	6,11452	0,1042
x_0	24,54815	16786261,87247
$A1$	2,93692	16940425,02948
$t1$	2,91019	0,71249

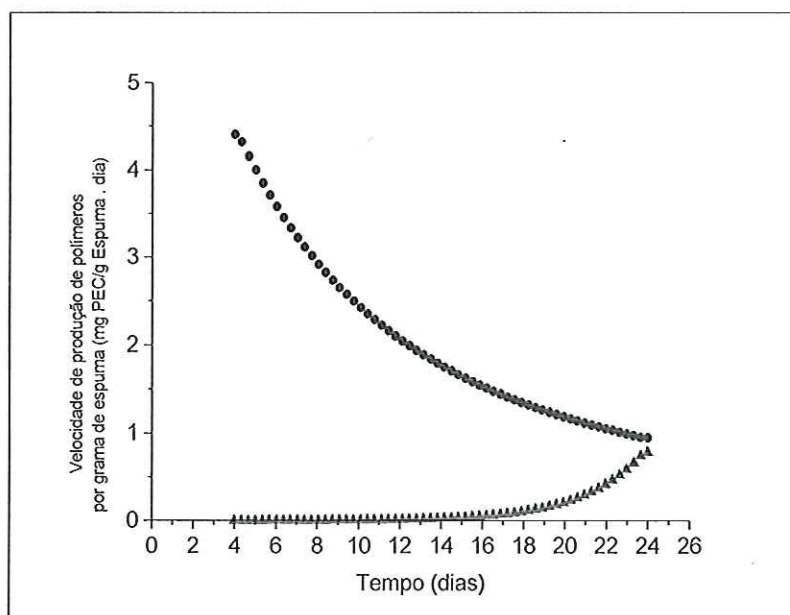


Figura 5.39: Velocidade de produção de polímeros (● carboidratos; ▲ proteínas), por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato.

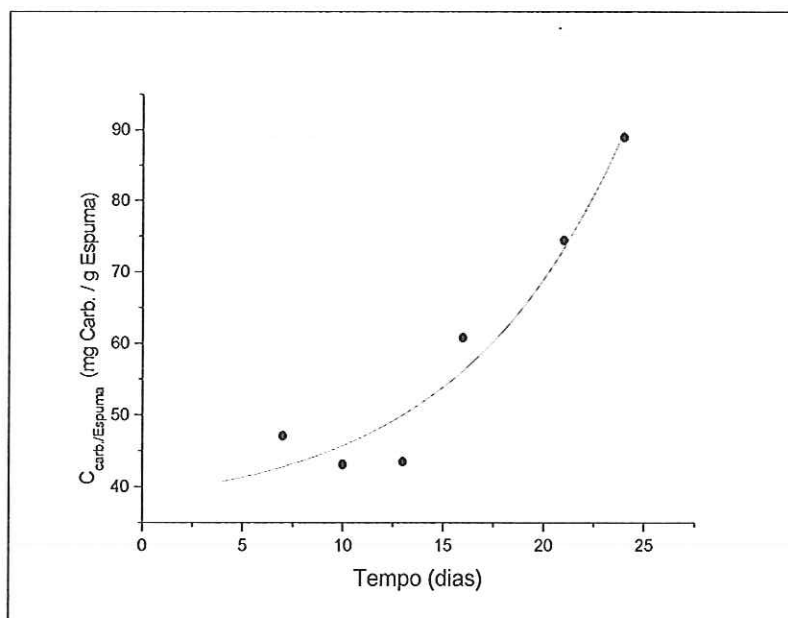


Figura 5.40: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. Valores experimentais (●) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.32: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato.

Modelo: Crescimento Exponencial

$$y = A1 * \exp(x - x_0 / t1) + y_0$$

$$R^2 = 0,9484$$

Parâmetro	Valor	Erro
y0	36.19155	15.48853
x0	11.8299	--
A1	12.00766	--
t1	8.12705	5.67471

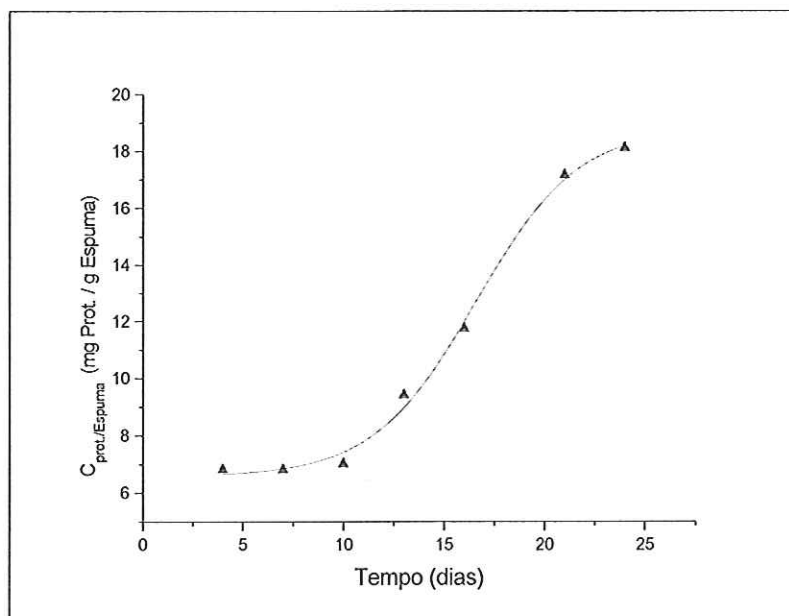


Figura 5.41: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. Valores experimentais (\blacktriangle) e modelo ajustado (—).

Tabela 5.33: Valores dos parâmetros da expressão ajustada para a excreção de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma ao longo do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato.

Modelo: Sigmoidal(Boltzman)

$$y = A2 + (A1 - A2) / (1 + \exp((x - x_0) / dx))$$

$$R^2 = 0,99659$$

Parâmetro	Valor	Erro
A1	6,58178	0,34608
A2	18,83002	0,72164
x0	16,57638	0,50523
dx	2,53407	0,46569

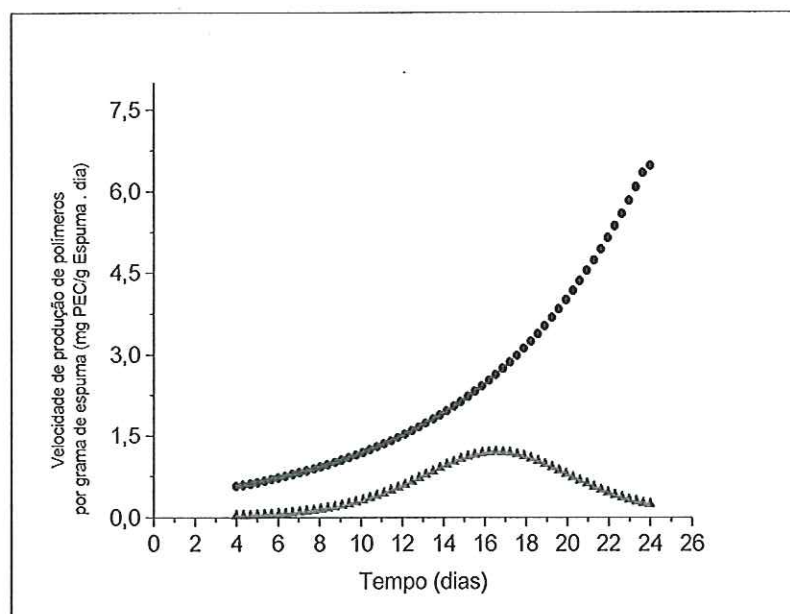


Figura 5.42: Velocidade de produção de polímeros (● carboidratos; ▲ proteínas), por grama de espuma, ao longo tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato.

A partir dos gráficos de velocidade de produção de polímeros por grama de espuma foram obtidos os valores para a produção máxima e mínima de polímeros por grama de espuma. Estes valores são apresentados na tabela 5.34.

Tabela 5.34: Dados referentes à velocidade de produção de polímeros por grama de espuma para os diversos substratos.

Substrato	Velocidade de produção de polímeros por grama de espuma (mg PEC/g Espuma.dia)							
	mg Carboidrato (Lactose)/g Espuma.dia				mg Proteína (S.A.B.)/g Espuma.dia			
	Máxima	Dia	Mínima	Dia	Máxima	Dia	Mínima	Dia
Glicose	4,4	12	0,094	24	0,45	*	0,45	*
Amido	7,0	12	0	4/24	0,96	24	0,16	4
Óleo de soja	5,2	24	0	4	0,76	24	0	4
Extrato de carne	4,4	4	0,95	24	0,79	24	0	4
Esgoto sintético	6,5	24	0,57	4	1,2	17	0	4/24

*A velocidade de excreção de polímeros por grama de espuma permaneceu constante ao longo de todo ciclo.

Os valores de excreção de polímeros na forma de carboidratos e proteínas por grama de espuma foram reunidos em dois gráficos respectivamente para uma melhor visualização da influência do substrato em tal processo. Estes gráficos são apresentados pelas Figuras 5.43 e 5.44.

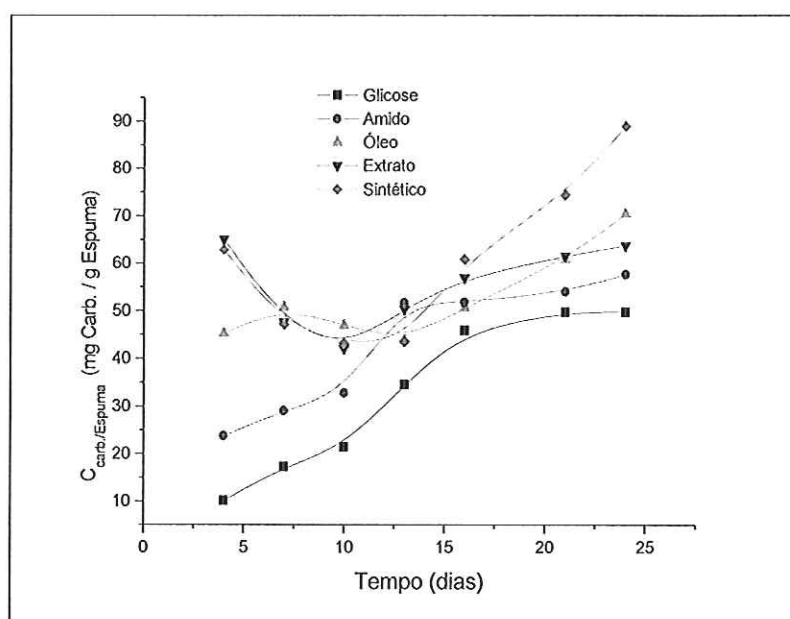


Figura 5.43: Massa de polímeros (medida na forma de carboidratos) por grama de espuma, ao longo tempo, para os substratos utilizados.

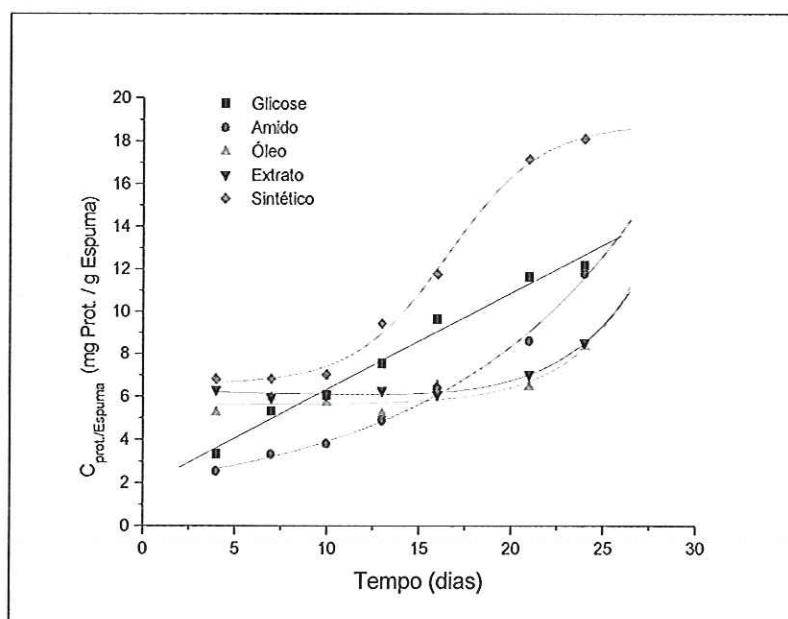


Figura 5.44: Massa de polímeros (medida na forma de proteínas) por grama de espuma, ao longo tempo, para os substratos utilizados.

As Figuras 5.43 e 5.44 indicam a tendência de crescimento na excreção de polímeros por grama de espuma. Este crescimento pode estar vinculado ao entupimento de reatores anaeróbios de leito fixo relatado freqüentemente na literatura (Zaiat et al., 2000), já que tais entupimentos não podem ser explicados pelos modelos para a colonização das espumas pela

biomassa anaeróbia, pois estes últimos indicam a estabilização na biomassa aderida a partir de um certo período.

No início da colonização, os polímeros possuem função específica de permitir ou facilitar a aderência de organismos no suporte inerte. A partir de um certo período, principalmente após o estabelecimento do biofilme, os polímeros liberados podem permanecer no interior dos suportes e nos interstícios do leito, causando problemas operacionais nos reatores de leito fixo. Estes problemas estão principalmente relacionados com a hidrodinâmica do sistema, a qual fica comprometida com ocorrência de caminhos preferenciais, zonas mortas e recirculação interna do líquido. A porosidade do leito é afetada, sofrendo diminuição efetiva ao longo do tempo, diminuindo, assim, os tempos de residência aplicados e aumentando a perda de carga no reator. Esses problemas progressivos podem culminar em impossibilidade de operação devido à perda de carga elevada e, até mesmo, entupimento do leito.

Em suma, o comportamento observado para a excreção de polímeros indica que reatores de leito fixo podem ter o escoamento prejudicado ou impossibilitado pela alta quantidade de material excretado pelos microorganismos e não somente pelo aporte de sólidos ao sistema ou pelo crescimento excessivo da biomassa, causas freqüentemente apontadas como principais interferentes em escoamentos e leitos fixos.

O controle da produção de polímeros pode ser difícil do ponto de vista metabólico, mas algumas estratégias operacionais podem ser adotadas para minimização do problema. Um exemplo seria a construção de reatores de leito fixo em módulos em série, os quais seriam alternados na operação do sistema. Os módulos iniciais seriam periodicamente trocados de posição na série, na direção do afluente para o efluente, chegando a ser o final do sistema. Neste caso, os polímeros produzidos quando o módulo estava submetido a altas concentrações de substrato poderão ser consumidos quando o módulo estiver recebendo baixa concentração de substrato, obrigando os organismos a utilizarem material de reserva. Dessa forma, os polímeros produzidos seriam consumidos dentro do próprio sistema, evitando problemas hidrodinâmicos e operacionais ou prolongando a “vida útil operacional” do sistema. Este rodízio deve estar previsto no projeto do sistema e os modelos aqui obtidos para excreção de polímeros podem ser usados para previsão da alternância dos módulos. Deve ser ressaltado, porém, que este raciocínio é válido se considerarmos reatores com alta relação comprimento por diâmetro, apresentando escoamento próximo ao que se espera para um tubular ideal.

5.3 Caracterização morfológica do lodo utilizado como inóculo

Como foi descrito na seção 4.4, foi utilizado como inóculo lodo granulado retirado de um reator UASB, tratando água residuária de um abatedouro de aves (Dacar Industrial S.A.) localizado no município de Tietê, SP. Ao longo do experimento, foram realizadas três coletas, sendo que após cada uma delas era realizada a caracterização morfológica dos microorganismos presentes. Como mencionado anteriormente, as análises microscópicas referentes às três coletas apresentaram as mesmas proporções em relação à distribuição morfológica encontrada. As amostras foram mantidas na geladeira para uma melhor conservação durante o período de execução da fase experimental.

A partir das análises de microscopia de contraste de fase e epifluorescência, constatou-se a presença das morfologias apresentadas na Figura 5.45: bacilos em cadeia (Figura 5.45 a); vibrios (Figura 5.45 b); filamentos (Figura 5.45 d); cocos (Figura 5.45 e, g, h); organismos com morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp (Figura 5.45 c) e semelhante a *Methanosarcina* sp. Também foram visualizados bacilos e cocos fluorescentes, provavelmente pertencentes aos gêneros *Methanobacterium*, *Methanococcus* e *Methanobrevibacter* (Figura 5.45 f).

De acordo com as análises realizadas, o inóculo utilizado apresentou uma grande variabilidade morfológica de bactérias e arqueas metanogênicas, sendo adequado para os estudos desenvolvidos neste trabalho.

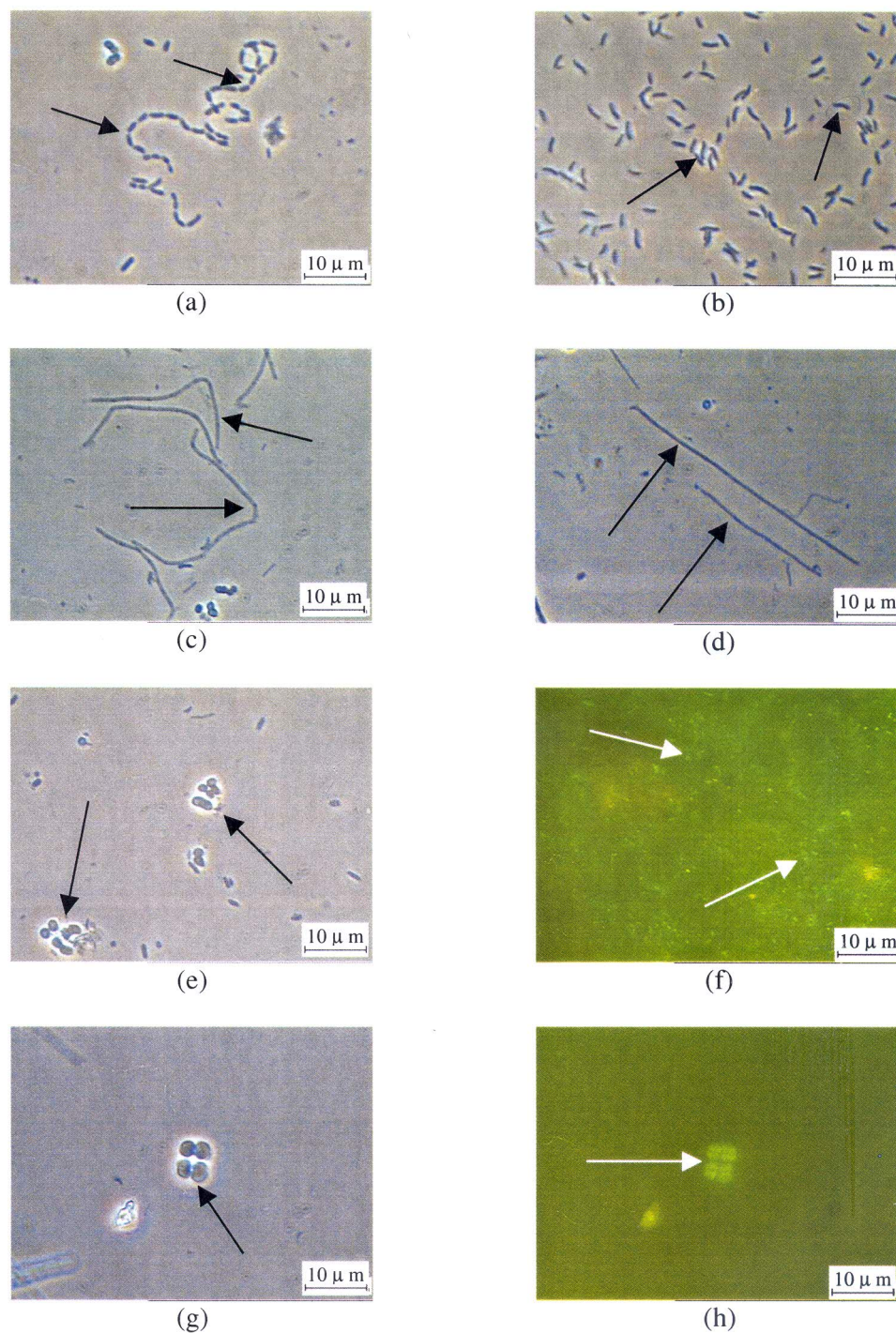


Figura 5.45: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e de epifluorescência do lodo granulado utilizado como inoculo: (a) bacilos em cadeia; (b) vibrios e bacilos; (c) organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (d) filamentos; (e) cocos; (f) bacilos e cocos fluorescentes; (g) e (h) cocos em tétrades.

5.4 Formação e evolução do biofilme anaeróbico em matrizes de poliuretano

A influência do substrato na dinâmica de aderência nas espumas de poliuretano foi avaliada através do acompanhamento da evolução do biofilme anaeróbico ao longo do tempo, a partir da retirada seqüencial dos sete reatores que compunham o ciclo, ou seja, no 4º, 7º, 10º, 13º, 16º, 21º e 24º dia de operação do sistema.

Através das análises morfológicas e dos resultados obtidos na quantificação da biomassa aderida e dos polímeros extracelulares excretados, pôde-se caracterizar o processo de colonização inicial das matrizes de poliuretano em reatores diferenciadas para cada substrato utilizado na alimentação.

As análises de microscopia eletrônica de varredura revelaram a existência de três padrões de imobilização (Figura 5.46). No estágio inicial de desenvolvimento do biofilme foram encontradas células aderidas às espumas de poliuretano, distribuídas randomicamente (Figura 5.46 a, b, c).

Uma fase intermediária também foi observada, onde as células encontravam-se aderidas umas às outras, ligadas através do polímero extracelular, constituindo o biofilme aderido mostrado na Figura 5.46 (d), (e), (f) (van LOOSDRECHT et al. 1990).

O outro padrão encontrado apresentava colônias na forma de microgrânulos de até 500 μm . Estes microgrânulos possivelmente poderiam estar mecanicamente retidos nos poros das matrizes (Figura 5.46 h), ou então poderiam ser oriundos da fase mais adiantada da colonização (Figura 5.46 h, i). Esses padrões de imobilização foram semelhantes aos relatados por VARESCHE et al. (1997) e TOMMASO et al. (1999) em reator anaeróbico horizontal de leito fixo (RAHLF) tratando glicose, e reator anaeróbico horizontal de leito fixo diferencial (RAHLFd) tratando proteína, respectivamente.

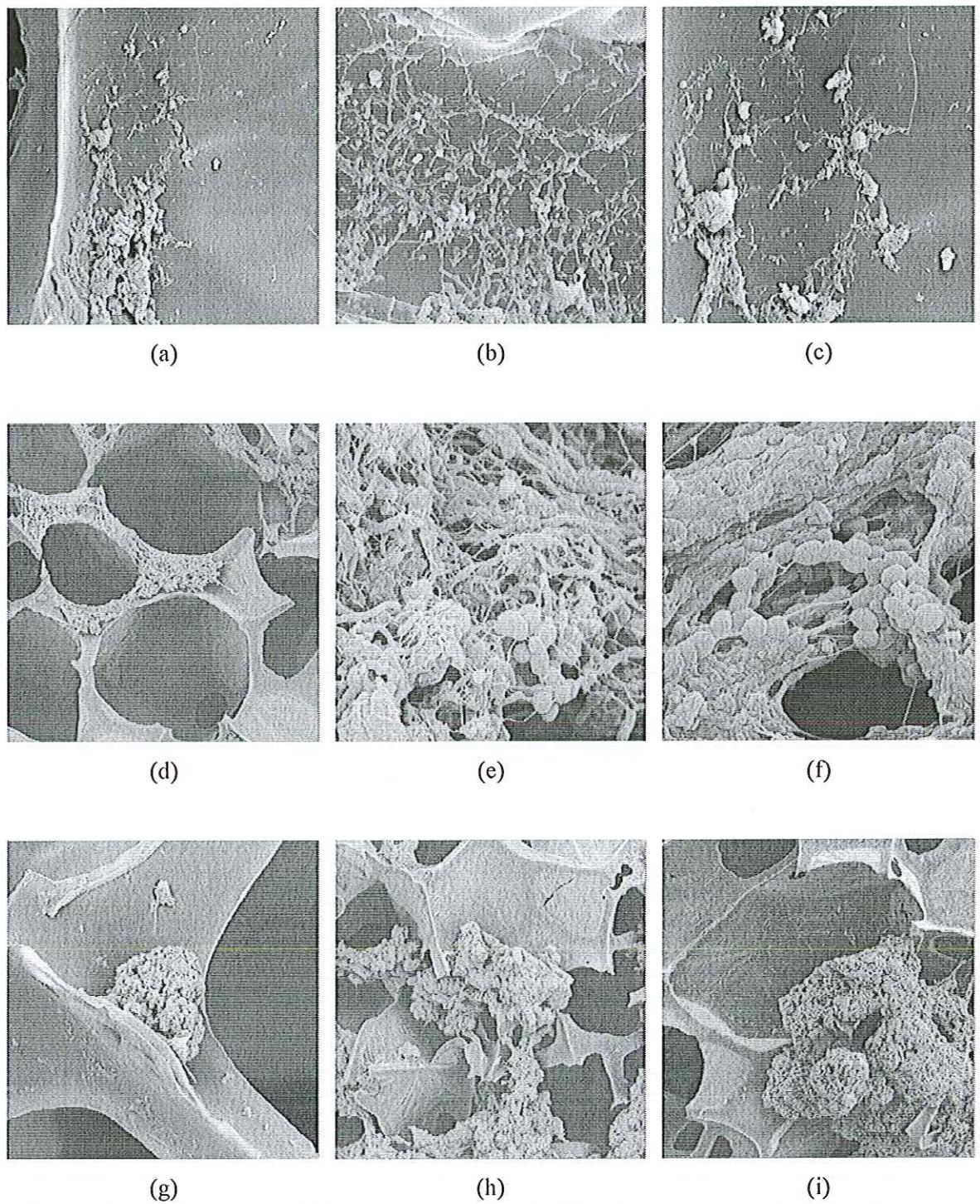


Figura 5.46: Padrões de imobilização no biofilme, observados sob microscopia eletrônica de varredura, para reatores utilizando diferentes substratos: estágio inicial de desenvolvimento (a, b, c); estágio intermediário (d, e, f); microgrânulos (g, h, i).

5.5 Dinâmica de colonização do biofilme anaeróbio em matrizes de poliuretano em reatores utilizando glicose como substrato

5.5.1. - 4º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato

As imagens de microscopia ótica revelaram a predominância de bacilos com extremidades afiladas, possivelmente sacarolíticos (Figura 5.47 a, b, c, g). Essas bactérias metabolizam a glicose na fase fermentativa do processo anaeróbio, produzindo vários subprodutos como etanol, lactato, acetato entre outros, dependendo do gênero de microorganismo envolvido no processo (MADIGAN et al., 2000). Estes subprodutos servem como substratos para outros microorganismos presentes no consórcio microbiano formado. Verificou-se também a presença de cocos em tétrades (Figura 5.47 a) e filamentos (Figura 5.47 d), além de raros vibrios. Nessa fase não foram observadas arqueas metanogênicas.

Nas análises em microscopia de varredura foram observadas as mesmas morfologias descritas anteriormente. Entretanto, através dessa análise pôde-se constatar que a colonização inicial das matrizes de poliuretano, no ciclo utilizando glicose como substrato, foi exclusivamente devido à aderência de bacilos com as extremidades afiladas. (Figura 5.47 g). Em outras regiões, constatou-se a presença de microgrânulos retidos, possivelmente mecanicamente, dentro dos poros das matrizes (Figura 5.47 h); com a predominância de bacilos (Figura 5.47 e, f) e presença de cocos em tétrades.

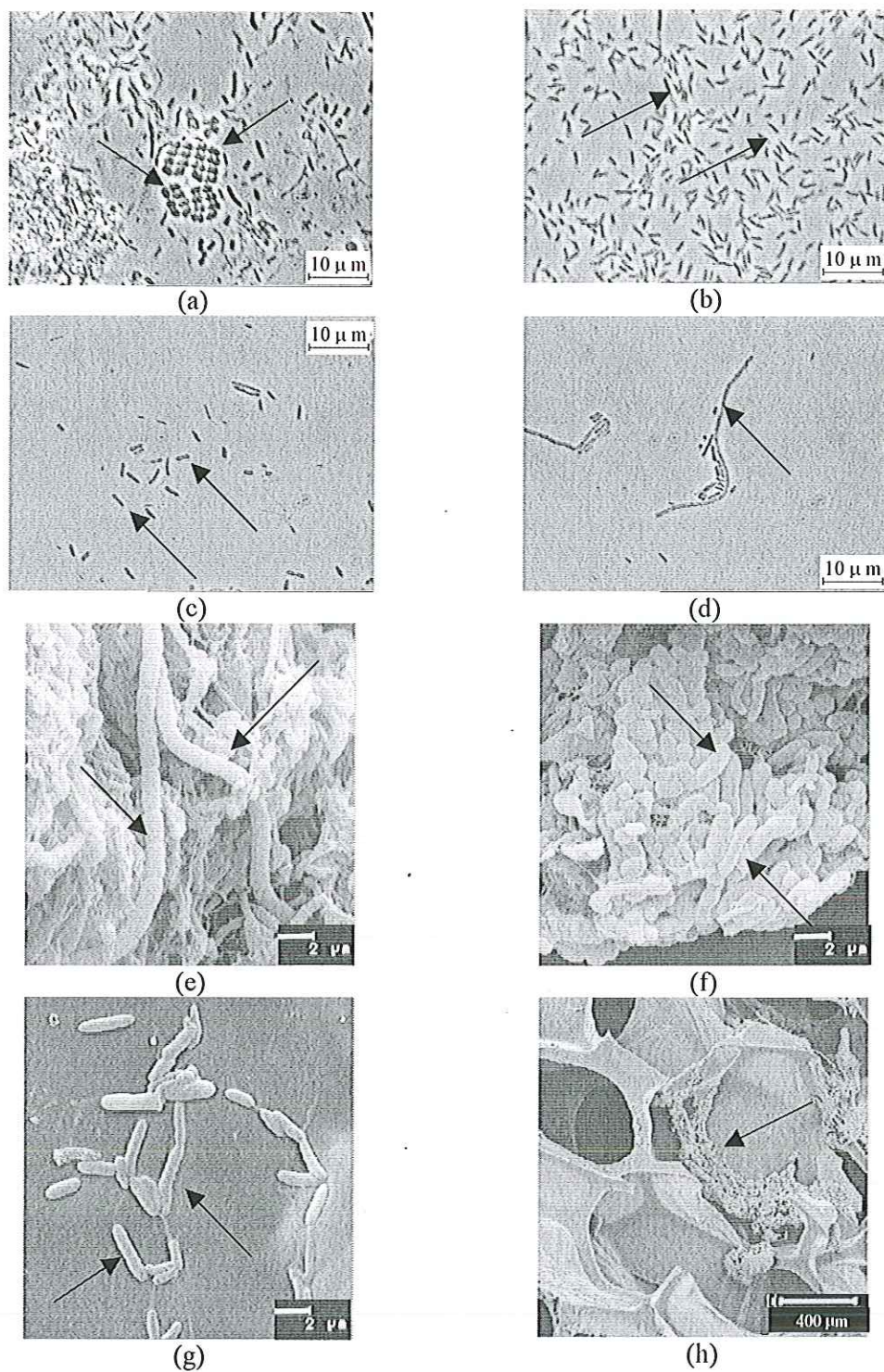


Figura 5.47: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 4º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato: (a) cocos em tétrades; (b),(c) e (g) bacilos com extremidades afiladas;(d) filamentos;(e) bacilos em cadeia; (f) bacilos; (h) microgrânulos.

5.5.2. - 7º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato

As imagens de microscopia ótica revelaram a predominância de bacilos com extremidades arredondadas (Figura 5.48 a, d) e presença de cocos isolados (Figura 5.48 b, c, d) , em cadeia, ou formando agrupamentos de cocos (Figura 5.48 b). A incidência de filamentos (Figura 5.48 c) também se deu de maneira mais acentuada que na amostragem anterior. As demais morfologias descritas anteriormente (4º dia) mantiveram-se nas mesmas proporções.

As análises de microscopia de varredura mostraram a predominância de bacilos nas regiões onde a colonização da espuma encontrava-se em uma fase inicial (Figura 5.48 e, f).

Nesse período foi possível visualizar a aderência de cocos na espuma e também no polímero extracelular (Figura 5.48 g, h). Vale ressaltar, segundo os valores apresentados na Tabela 5.23, que as velocidades máximas para a excreção de polímeros, na forma de polissacarídeos e polipeptídios, foram encontradas no 7º dia de ciclo.

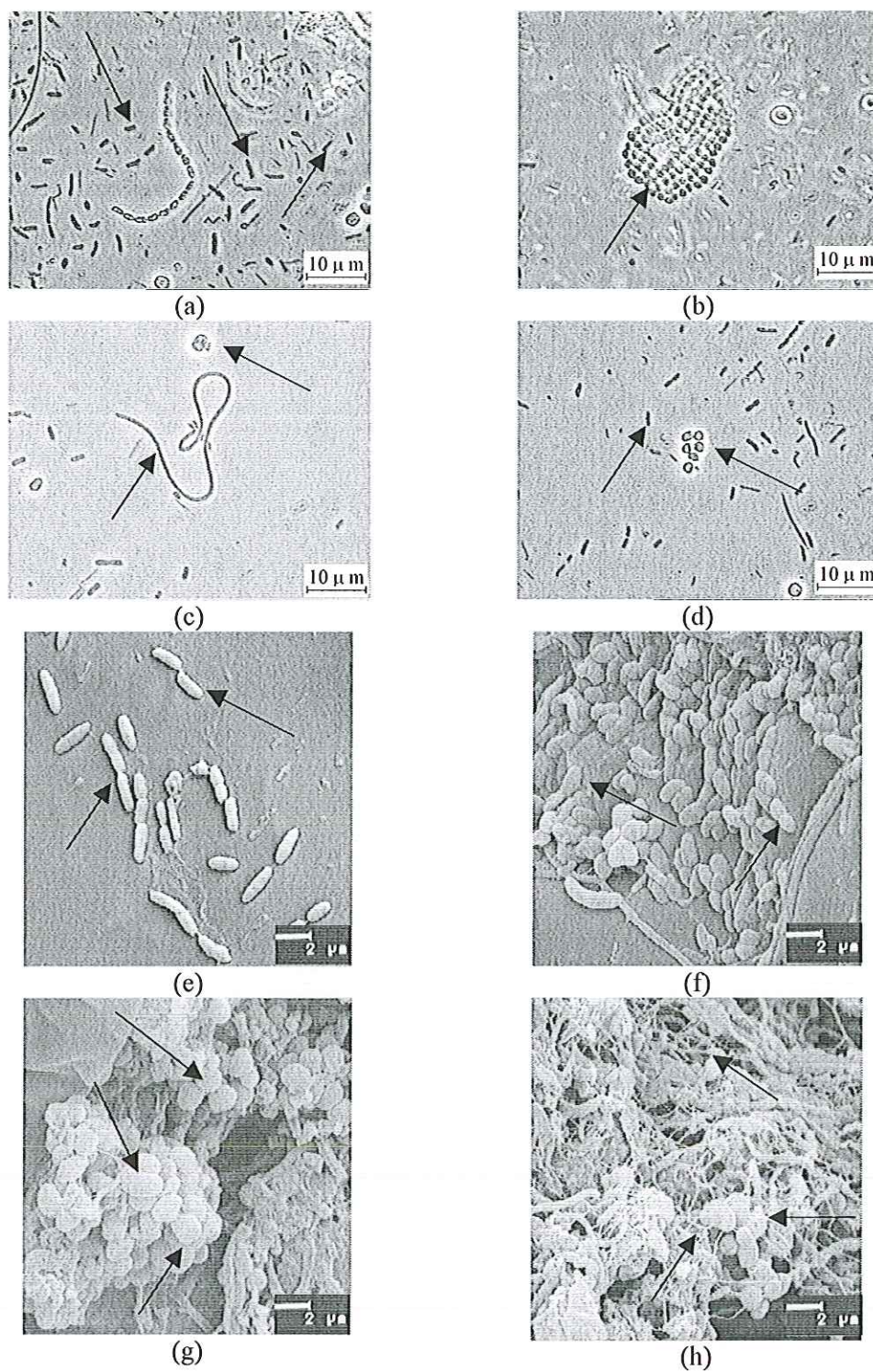


Figura 5.48: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 7º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato: (a) bacilos com extremidades arredondadas; (b) arranjo de cocos; (c) filamentos e cocos; (d) bacilos e cocos; (e) bacilos; (f) bacilos ovalados; (g) cocos; (h) polímero extracelular.

5.5.3. - 10º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato

Segundo as análises de microscopia de contraste de fase, constatou-se a predominância de bacilos e cocos. Os bacilos foram encontrados principalmente na forma de cadeia (Figura 5.49 a) e bacilos de extremidades arredondadas (Figura 5.49 a, d). Os cocos observados foram encontrados na forma de cocos em tétrades (Figura 5.49 c), ou na forma de coco-bacilos (Figura 5.49 a). Foi observada a presença de filamentos (Figura 5.49 b).

As análises de microscopia de epifluorescência realizadas mostraram a ocorrência de organismos de morfologia semelhante ao gênero *Methanosarcina* sp. É interessante ressaltar que, a partir do 10º dia, como observado na Figura 5.1, houve a diminuição sensível da concentração de matéria orgânica ao final da batelada, podendo se atribuir este fato à conversão a metano, através do metabolismo das arqueas metanogênicas presentes no reator.

Segundo a microscopia eletrônica de varredura, as amostras coletadas no 10º dia de ciclo apresentaram a predominância de cocos nas regiões onde a colonização se encontrava em uma fase mais adiantada (Figura 5.49 e, g). Entretanto, cocos e bacilos predominaram nas regiões que se encontravam em etapa inicial de colonização (Figura 5.49 f, h).

Constatou-se que no processo inicial de colonização de matrizes de poliuretano em reatores alimentados com glicose, os cocos se aderem preferencialmente à camada inicial de microorganismos formada por bacilos (Figura 5.49 f, g, h).

Uma grande quantidade de polímero extracelular foi observada nas amostras retiradas no 10º dia de operação (Figura 5.50 a, b). Verificou-se, através das análises de microscopia de varredura, que a produção de polímeros extracelulares está diretamente ligada à aderência inicial dos microrganismos à espuma de poliuretano. Estas imagens vão de encontro aos resultados obtidos na quantificação de polímeros na forma de polissacarídeos e polipeptídios (Figuras 5.11 e 5.12), onde a maior produção específica de polímeros foi obtida por volta do 10º dia de operação.

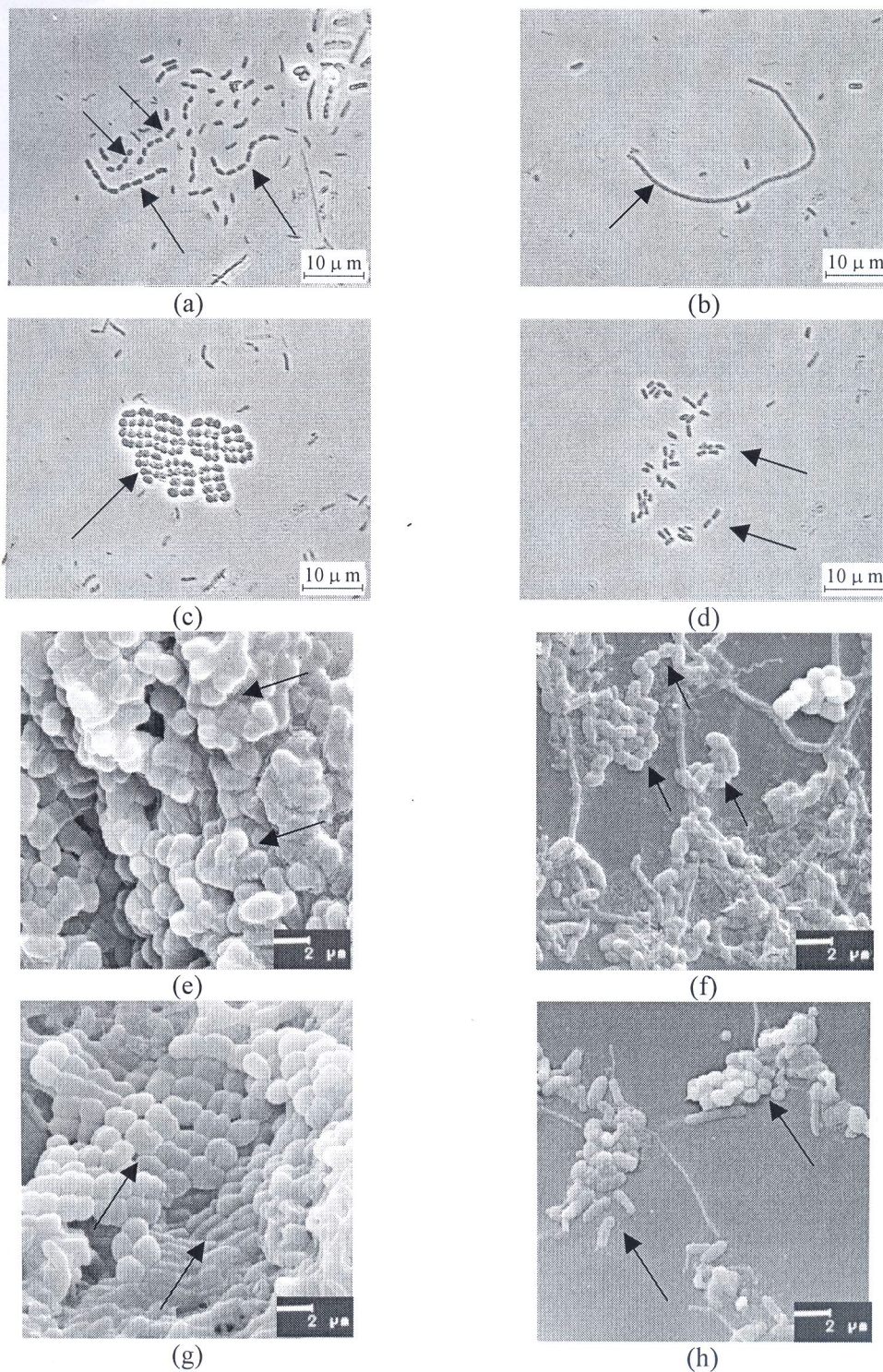


Figura 5.49: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 10º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato: (a) bacilos e coco-bacilos na forma de cadeia; (b) filamentos; (c) cocos em tétrades; (d) bacilos com extremidades arredondadas; (e) cocos; (f) bacilos; (g) cocos e bacilos; (h) cocos aderidos aos bacilos.

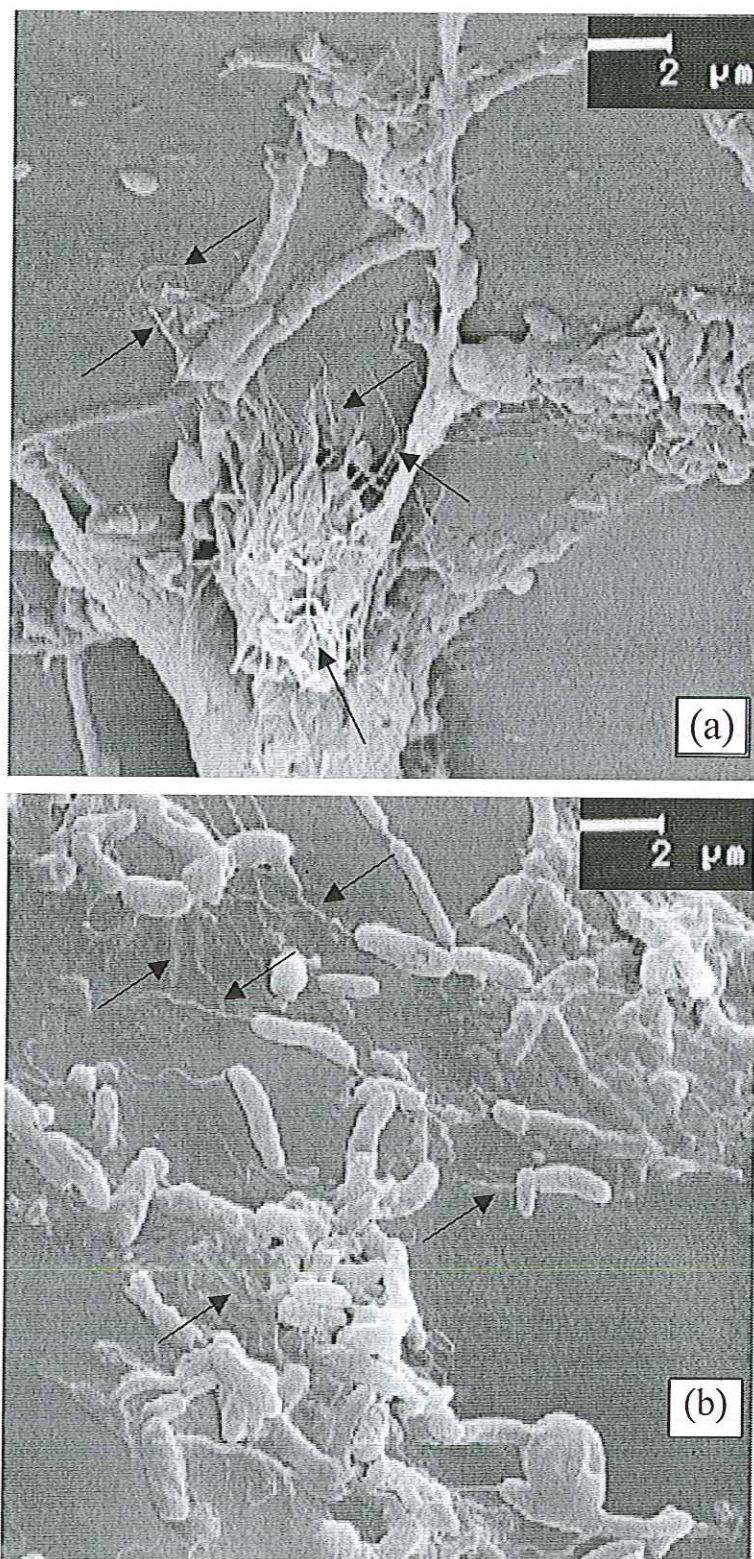


Figura 5.50: Observações sob microscopia eletrônica de varredura dos polímeros extracelulares referentes às amostras retiradas dos reatores provenientes do ciclo utilizando glicose como substrato.

5.5.4. - 13º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato

Através da imagem da Figura 5.51 (a), pode-se verificar as etapas de colonização de superfície das matrizes por microorganismos na formação do biofilme. A definição desses padrões de colonização em suportes inertes foi mencionada por van LOOSDRECHT et al. (1990). Na Figura 5.51 (b), pode-se observar as fases de aderência inicial e fixação, onde bacilos produzem polímeros extracelulares para se fixarem irreversivelmente à espuma. A formação de microcolônias, onde a aderência entre as células ocorre com maior frequência, pode ser vista na Figura 5.51 (c). Finalmente, a Figura 5.51 (d) mostra a colonização em um estágio mais avançado, com uma matriz polimérica e tipos morfológicos distintos.

Como nas amostras referentes ao 10º dia, os microorganismos predominantes foram os bacilos (Figura 5.52 b, c, d) e os cocos (Figura 5.52 b, d).

No 13º dia de operação observou-se a maior ocorrência de microorganismos fluorescentes de morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp (Figura 5.52 a). Bacilos e cocos fluorescentes também foram observados, provavelmente semelhantes a *Methanobacterium*, *Methanococcus* e *Methanobrevibacter*. Provavelmente, a presença dessas arqueas metanogênicas esteja relacionada com a utilização de acetato, CO₂, etanol, provenientes da fermentação da glicose (KÖNIG & STETTER, 1988).

As análises de microscopia de varredura, de acordo com a Figura 5.52 (f, g), mostraram a predominância de bacilos nas regiões onde a colonização da espuma encontrava-se em uma fase inicial. Cocos passaram a predominar nas regiões onde a colonização encontrava-se em um estágio mais adiantado (Figura 5.52 e, h).

Vale ressaltar que a velocidade máxima de colonização das matrizes de poliuretano, para o ciclo utilizando glicose como substrato, foi atingida por volta do 14º dia, como constatado pela Figura 5.10 e Tabela 5.12.

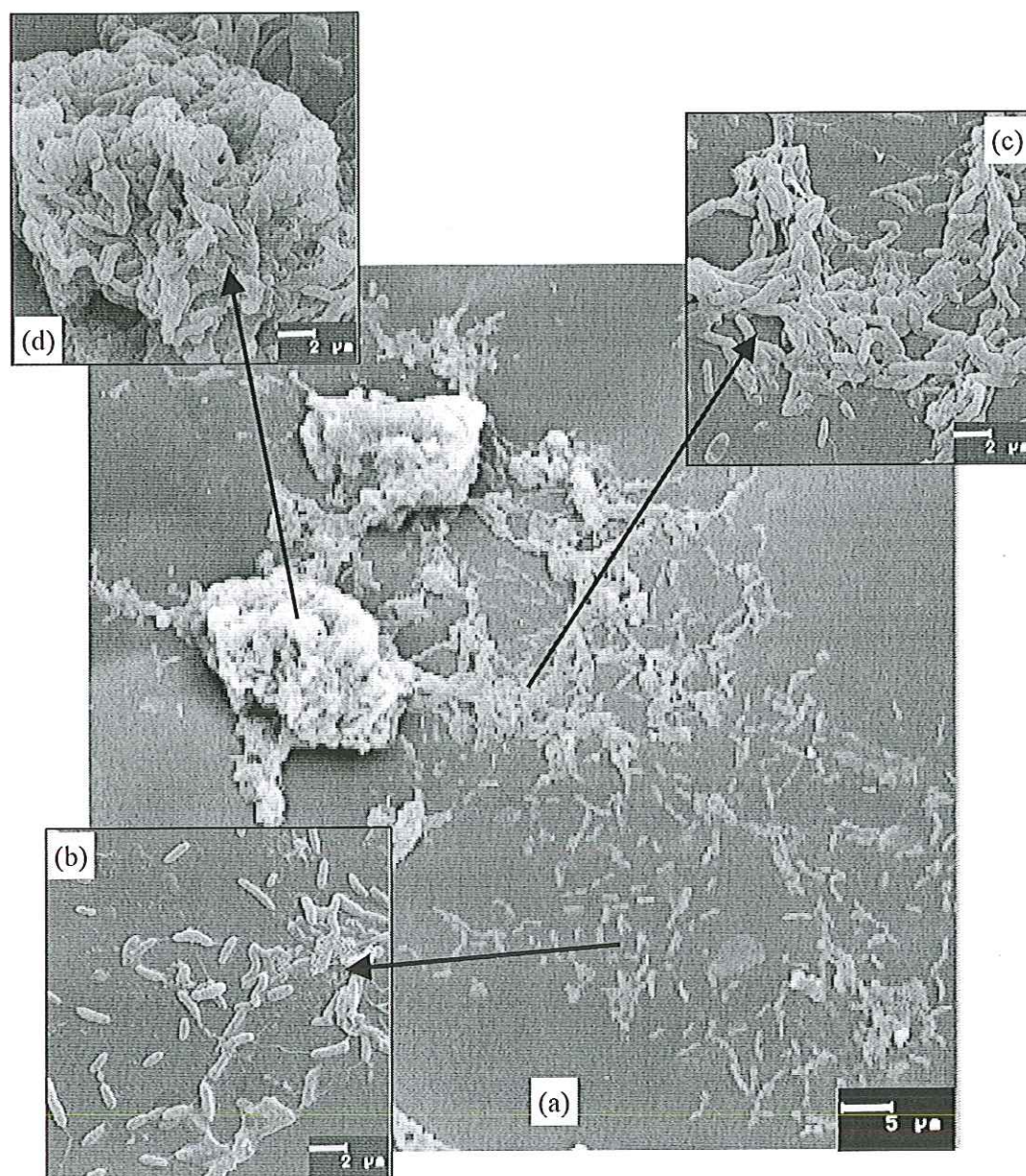


Figura 5.51: Observações sob microscopia eletrônica de varredura da fase inicial de colonização da espuma para os reatores provenientes do ciclo utilizando glicose como substrato: (a) visão geral da colonização da espuma; (b) aderência inicial e fixação das células; (c) formação de microcolônias; (d) biofilme.

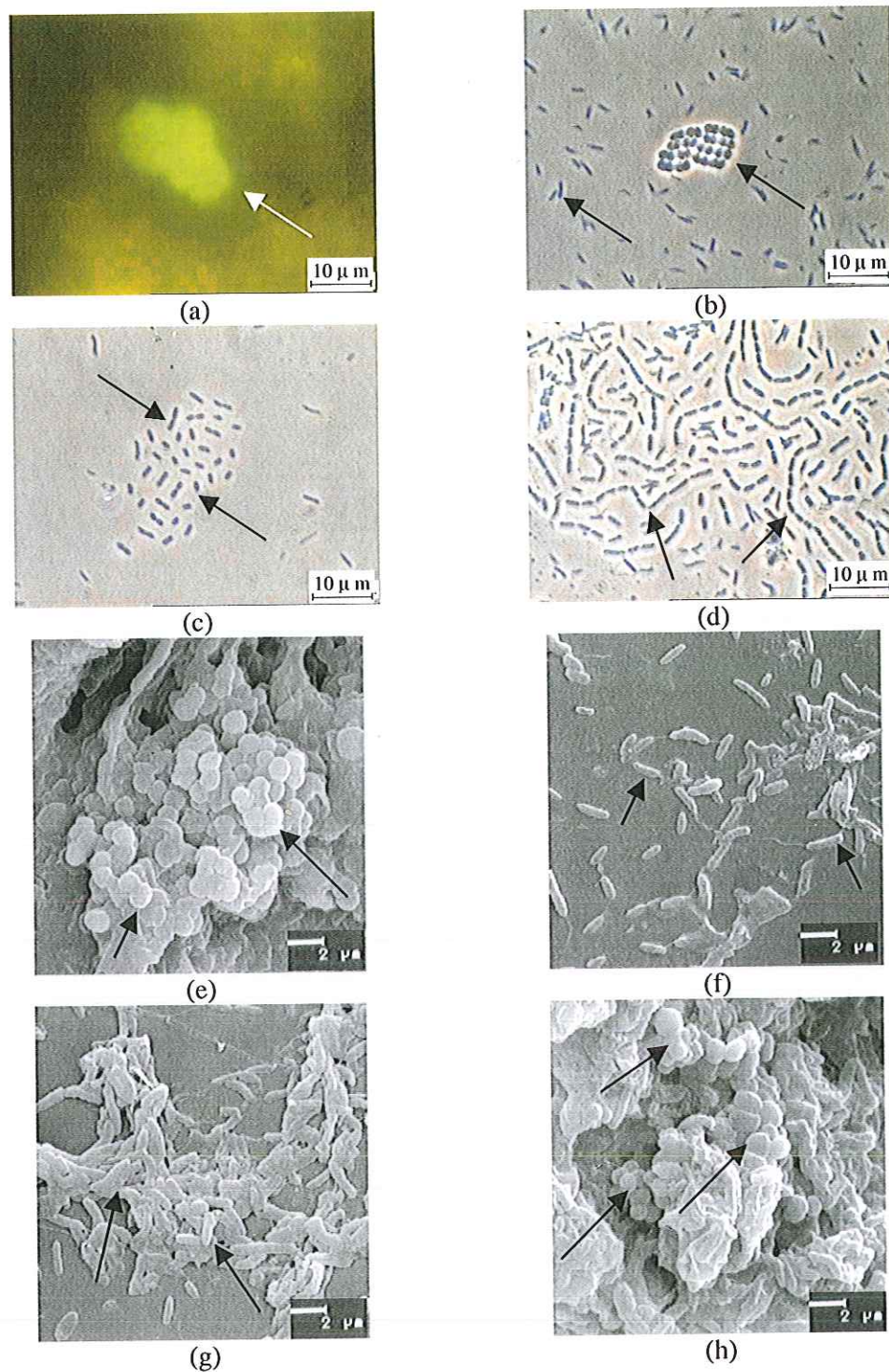


Figura 5.52: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 13º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato: (a) microorganismo semelhante a *Methanosarcina* sp; (b) cocos e bacilos; (c) bacilos; (d) bacilos em cadeia; (e) cocos; (f) bacilos; (g) bacilos; (h) cocos.

5.5.5. - 16º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato

Como nas amostras referentes ao 10º e 13º dias de ciclo, as análises de microscopia de contraste de fase mostraram a predominância de bacilos (Figura 5.53 b, c) e cocos (Figura 5.53 a, c). Bactérias filamentosas também foram encontradas.

Nas amostras coletadas no 16º dia foram encontrados microorganismos de morfologia semelhante as arqueas *Methanosaeta* sp (Figura 5.53 d). Organismos fluorescentes de morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp não foram mais encontrados. Bacilos e cocos fluorescentes também foram observados.

As análises de microscopia de varredura mostraram a predominância de cocos nas amostras analisadas (Figura 5.53 e, f, g, h). Nas regiões onde a colonização se encontrava mais adiantada observou-se a presença de uma grande quantidade de filamentos (Figura 5.53 e).

Organismos de morfologia semelhante as arqueas *Methanosaeta* sp (Figura 5.53 h) foram encontradas pela primeira vez.

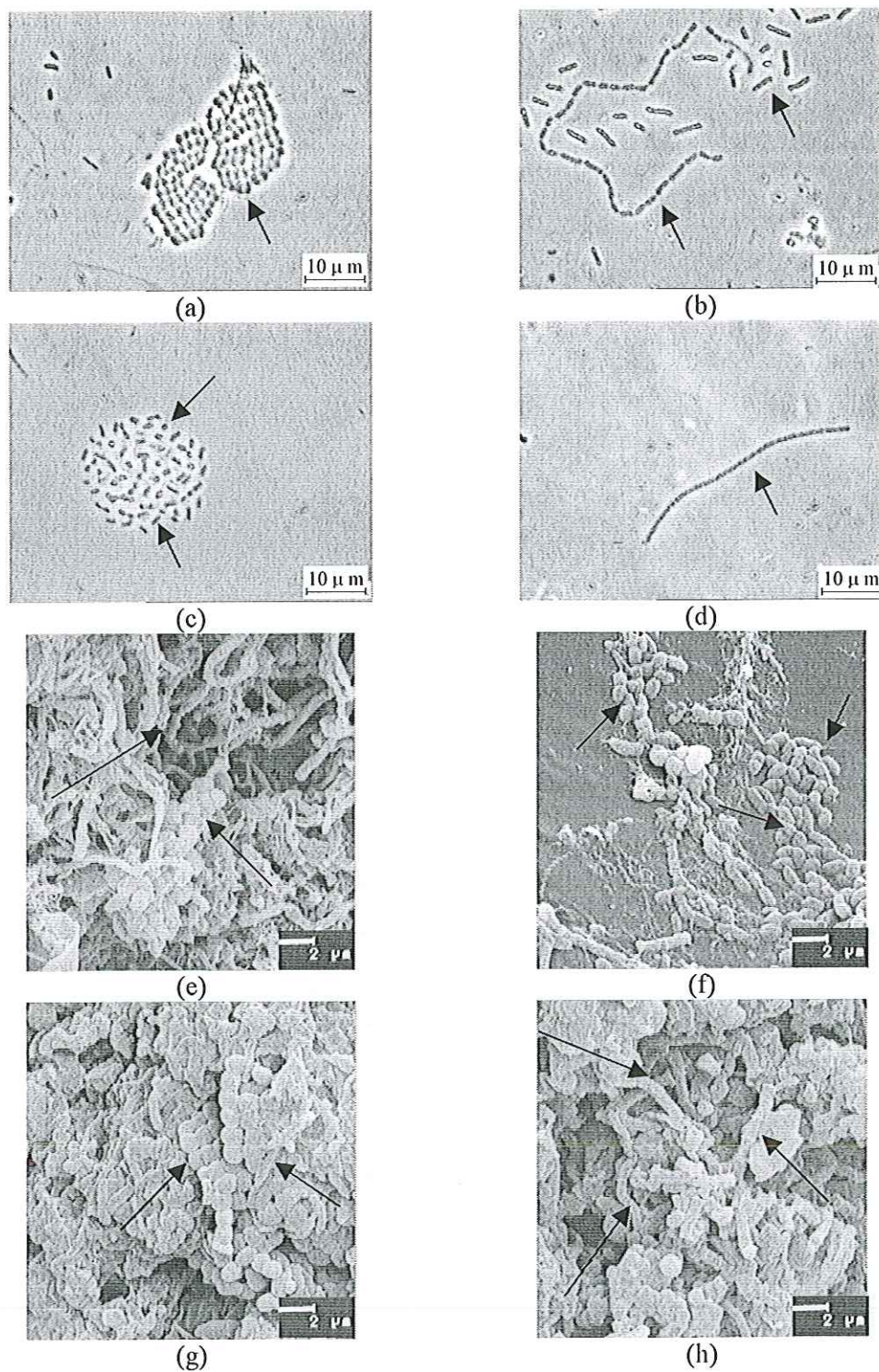


Figura 5.53: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 16º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato: (a) cocos; (b) bacilos; (c) bacilos e cocos; (d) microorganismo semelhante a *Methanosaeta* sp.; (e) filamentos e cocos; (f) e (g) cocos; (h) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp.

5.5.6. - 21º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato

As análises de microscopia de contraste de fase mostraram a predominância de cocos (Figura 5.54 a). Bacilos foram encontrados, entretanto em menor quantidade que nas amostras anteriores (Figura 5.54 d). Filamentos (Figura 5.54 c), vibrios (Figura 5.54 b, c) e microorganismos de morfologia semelhante às arqueas do gênero *Methanosaeta* sp também foram encontrados. Os vibrios podem ser relacionados com as bactérias redutoras de sulfato, as quais na ausência de fonte de enxofre realizam metabolismo mixotrófico usando hidrogênio como fonte de energia e assimilam o acetato mais o CO₂, ou extrato de levedura como fontes de carbono (POSTGATE, 1988). Os exames de microscopia de epifluorescência identificaram grande quantidade de microorganismos semelhantes a bacilos e cocos.

As amostras coletas no 21º dia de operação assemelham-se muito as do 16º dia. Da mesma forma, há a predominância de cocos (Figura 5.54 e, f, g, h), além da presença da grande quantidade de filamentos nas amostras analisadas. Microorganismos de morfologia semelhante as arqueas do gênero *Methanosaeta* sp foram encontrados em maior quantidade (Figura 5.54 f).

Constatou-se, a partir do 21º dia de operação, que a quantidade de biomassa aderida às espumas de poliuretano permaneceu praticamente constante, indicando a estabilização do biofilme formado.

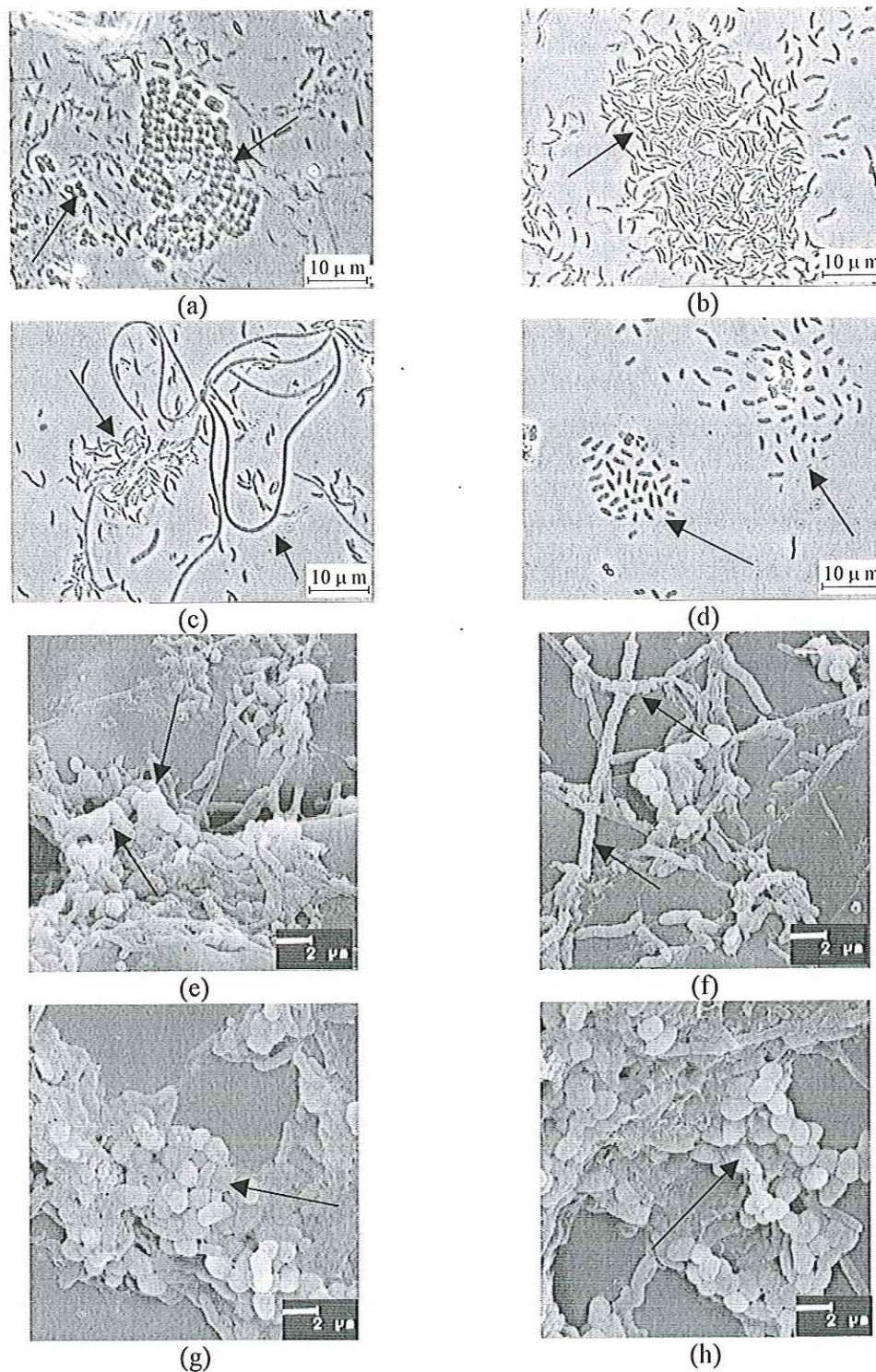


Figura 5.54: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 21º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato: (a) cocos; (b) vibrios; (c) filamentos e vibrios; (d) bacilos ;(e), (g) e (h) cocos; (f) microorganismo semelhante a *Methanosaeta* sp; (g) cocos; (h).

5.5.7. - 24º dia de operação do ciclo utilizando glicose como substrato

As amostras coletadas no 24º dia do ciclo apresentaram a predominância de filamentos (Figura 5.55 b). Todavia, a constatação mais importante foi à diminuição dos cocos, bacilos e vibrios (Figura 5.55 c). Em contrapartida, ocorreu a maior ocorrência de microorganismos pertencentes ao grupo das arqueas metanogênicas, principalmente os que apresentavam morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp (Figura 5.55 d). Cocos e bacilos fluorescentes também foram observados em grande quantidade (Figura 5.55 a).

Os exames de microscopia de varredura mostraram a grande incidência de cocos (Figura 5.55 f, h), filamentos (Figura 5.55 e) e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.55 e, h). É interessante ressaltar que alguns microorganismos de morfologia semelhantes a cocos possuíam tamanho muito reduzido, apresentando aproximadamente 0,25 µm de diâmetro (Figura 5.55 f). Já os bacilos só foram encontrados em regiões onde a colonização da espuma encontrava-se em uma fase inicial (Figura 5.55 g).

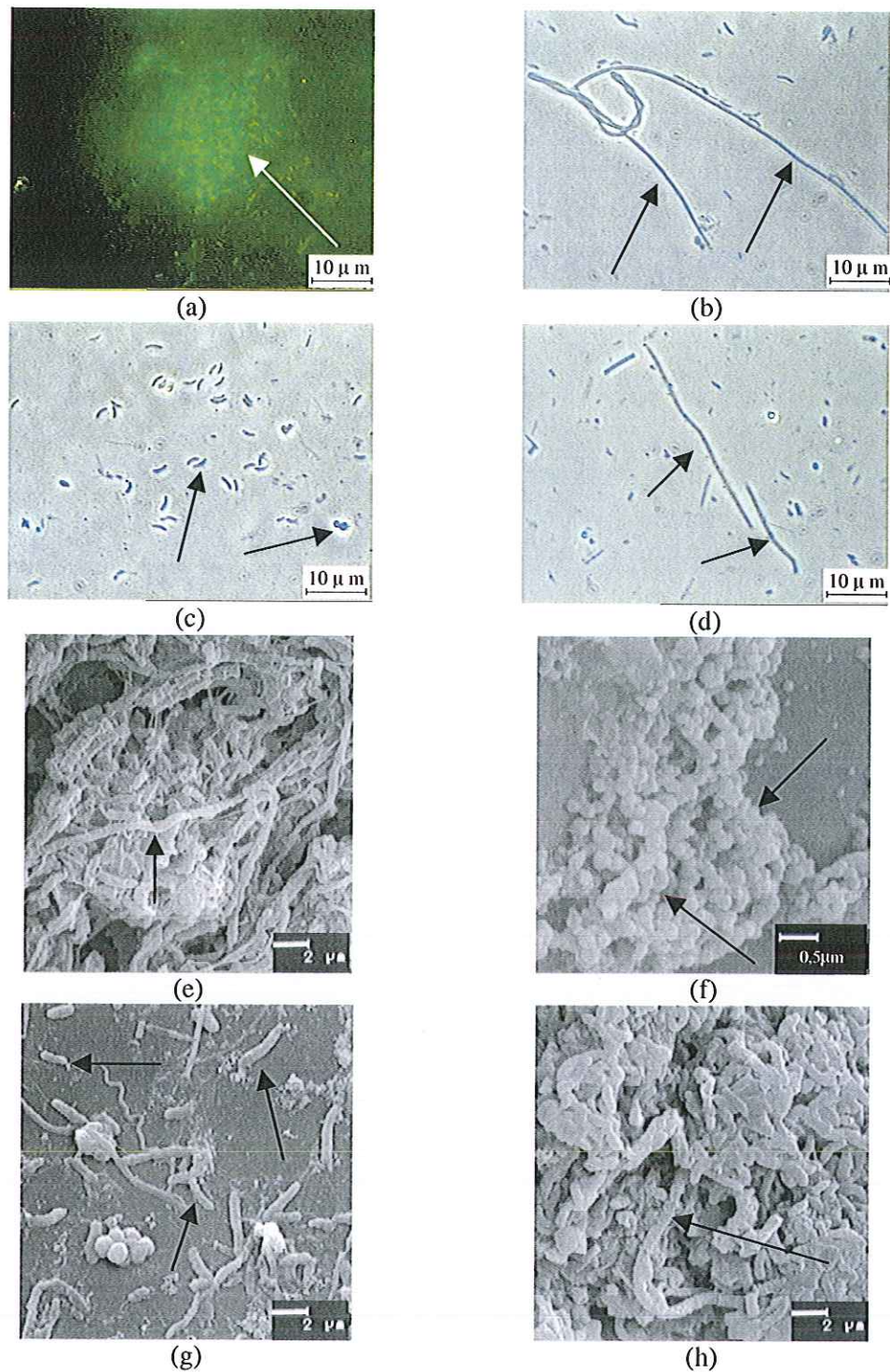


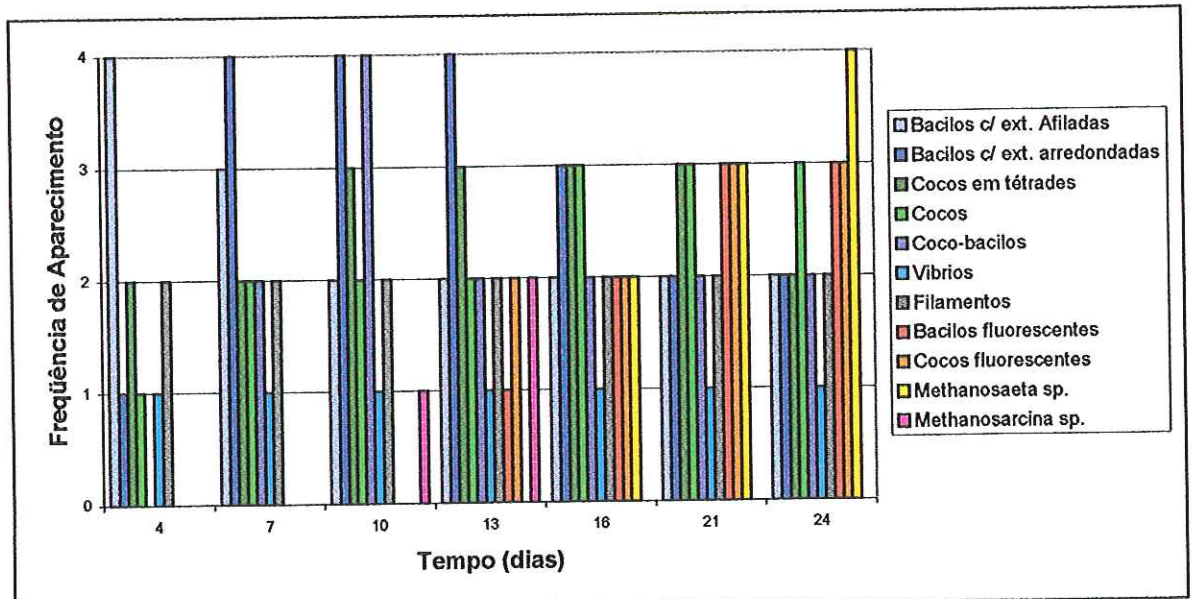
Figura 5.55: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 24º dia do ciclo, utilizando glicose como substrato: (a) bacilos e cocos fluorescentes; (b) filamentos; (c) vibrios; (d) microorganismo semelhante a *Methanosaeta* sp; (e) filamentos; (f) cocos; (g) bacilos; (h) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp.

De modo a facilitar a visualização da seqüência morfológica dos microorganismos presentes nos reatores alimentados com glicose, construíu-se uma tabela e um gráfico contendo a relação das morfologias observadas nos dias amostrados (Tabela 5.35; Figura 5.56). Na quantificação dos microorganismos, procurou-se percorrer o maior número de campos possíveis, anotando as morfologias encontradas em cada campo.

Tabela 5.35: Morfologias dos microorganismos presentes nos reatores ao longo do ciclo alimentado com glicose.

Morfologias	Glicose						
	Tempo (dias)						
	4°	7°	10°	13°	16°	21°	24°
Bacilos com extremidades afiladas	++++	+++	++	++	++	++	++
Cocos em tétrades	++	++	+++	+++	+++	+++	++
Filamentos	++	++	++	++	++	++	++
Bacilos Fluorescentes	-	-	-	+	++	+++	+++
Cocos fluorescentes	-	-	-	++	++	+++	+++
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	-	+	++	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	-	-	-	++	+++	++++
Vibrios	+	+	+	+	+	+	+
Cocos	+	++	++	++	+++	+++	+++
Bacilos com extremidades arredondadas	+	++++	++++	++++	+++	++	++
Coco-bacilos	-	++	++++	++	++	++	++

(++++) Predominantes; (+++) frequentes; (++) pouco frequentes; (+) raros; (-) não foram encontrados.



Frequência de Aparecimento: (4) Predominantes; (3) frequentes; (2) pouco frequentes; (1) raros; (0) não foram encontrados.

Figura 5.56: Frequência de aparecimento das morfologias, ao longo do tempo, para o ciclo utilizando glicose como substrato.

5.6 Dinâmica de colonização do biofilme anaeróbio em matrizes de poliuretano em reatores utilizando amido como substrato

5.6.1. - 4º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato

O amido é degradado por várias bactérias sendo hidrolisado pela ação da amilase, quebrando-o em moléculas de glicose. A glicose é então fermentada anaerobiamente, produzindo subprodutos que são utilizados por outros microorganismos presentes no biofilme (MADIGAN et al., 2000).

As análises de microscopia ótica e eletrônica de varredura mostraram a predominância de vibrios (Figura 5.57 a, e), e bacilos com extremidades afiladas e bacilos retos (Figura 5.57 c, d, e, g, h). Essas bactérias estão provavelmente ligadas à hidrólise do amido ou então à fermentação anaeróbia da glicose. Verificou-se também a presença de filamentos semelhante a *Methanosaeta* sp (Figura 5.57 b) e cocos (Figura 5.57 d, f).

Nas análises em microscopia de varredura observou-se que a colonização inicial, da mesma forma que no ciclo utilizando glicose como substrato, foi preferencialmente devido à aderência de bacilos com as extremidades afiladas. (Figura 5.57 g). As formas de colonização foram as mesmas obtidas para glicose; ou seja: microgrânulos; células aderidas às espumas; células que se encontravam aderidas umas às outras, formando um biofilme.

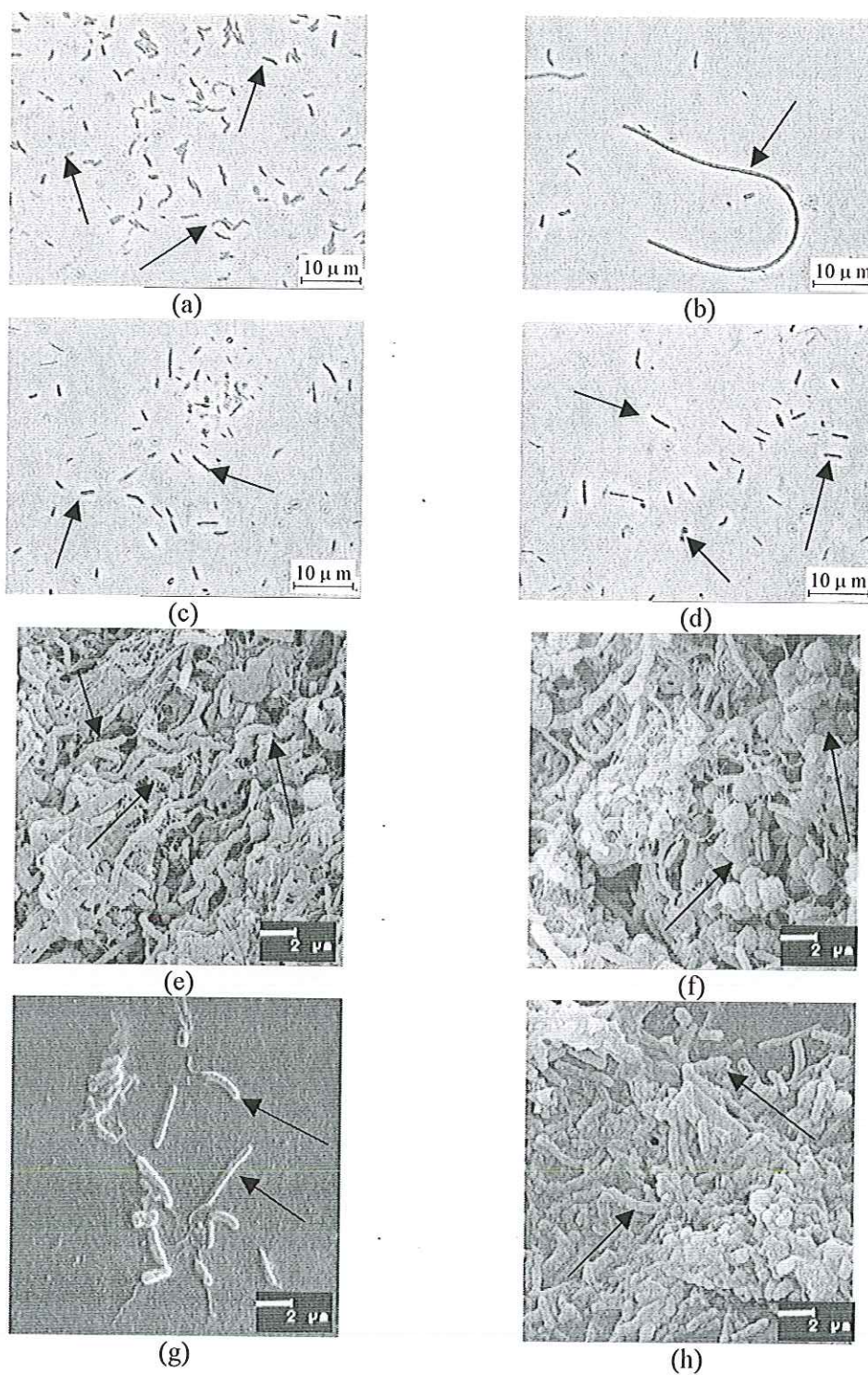


Figura 5.57: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 4º dia do ciclo, utilizando amido como substrato: (a) vibrios; (b) filamentos; (c) bacilos com extremidades afiladas e bacilos retos; (d) bacilos e cocos; (e) vibrios e bacilos; (f) cocos; (g) e (h) bacilos.

5.6.2. - 7º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato

As análises de microscopia de contraste de fase, referentes às amostras do 7º dia, mostraram que as morfologias descritas anteriormente (4º dia) mantiveram-se nas mesmas proporções, com a predominância de vibrios (Figura 5.58 b) e bacilos de extremidades arredondadas (Figura 5.58 d). Verificou-se também a presença de filamentos (Figura 5.58 c) e cocos (Figura 5.58 a).

Através das análises de microscopia eletrônica de varredura constatou-se a aderência de vibrios (Figura 5.58 g, h) e bacilos (Figura 5.58 h) às matrizes de poliuretano. Verificou-se a predominância de cocos (Figura 5.58 f) e filamentos (Figura 5.58 e) nas colônias em estágio mais avançado de colonização. Microorganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp também foram encontrados.

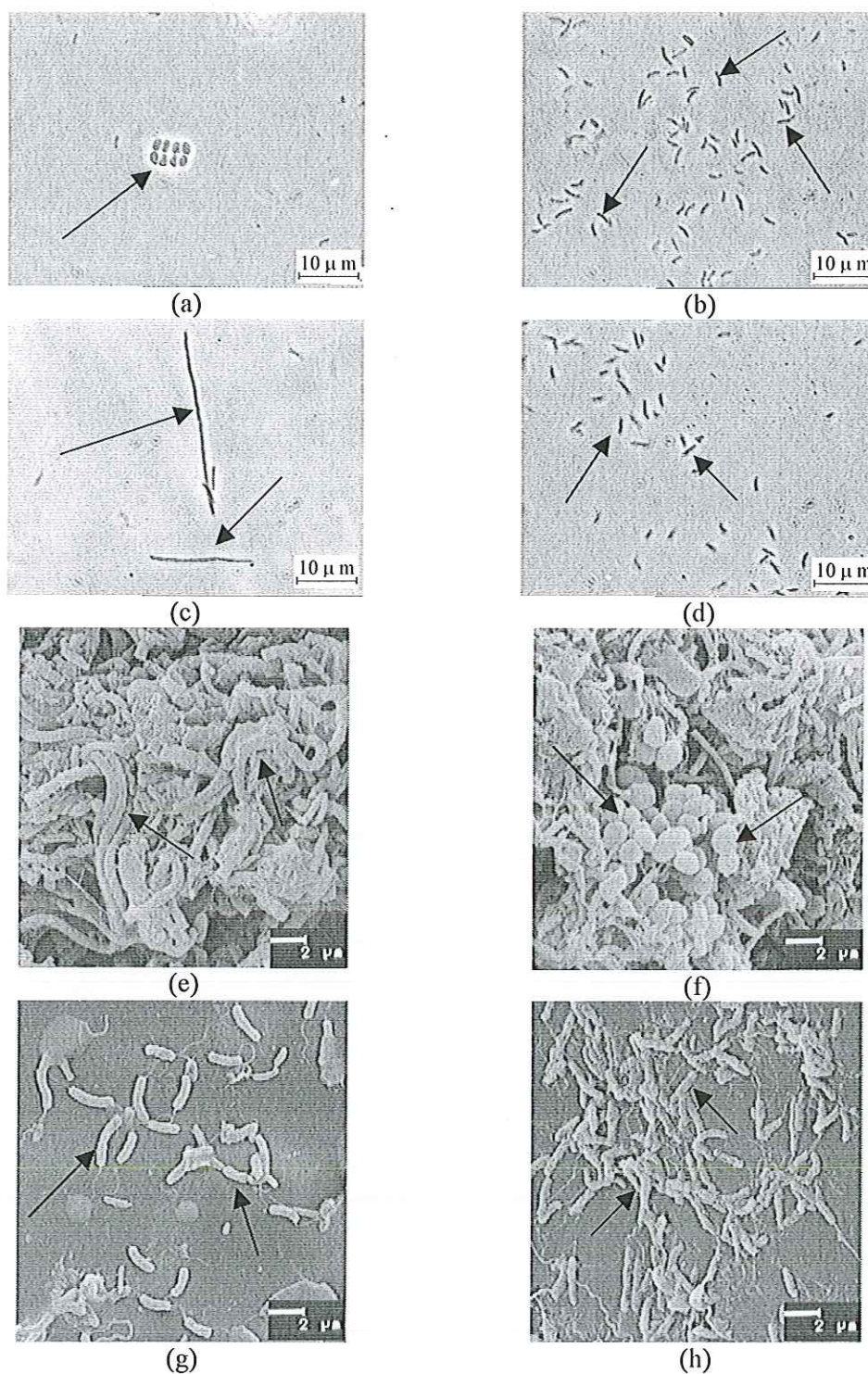


Figura 5.58: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 7º dia do ciclo, utilizando amido como substrato: (a) cocos; (b) vibrios; (c) filamentos; (d) bacilos; (e) filamentos; (f) cocos; (g) vibrios; (h) bacilos e vibrios.

5.6.3. - 10º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato

No ciclo utilizando amido como substrato, pode-se constatar que a formação do biofilme apresentou a mesma seqüência de colonização observada na etapa alimentada com glicose (Figura 5.59 a). Em regiões onde a colonização da espuma encontrava-se numa fase inicial, pode-se constatar a aderência de bacilos e a presença de polímero extracelular (Figura 5.59 b). Na Figura 5.59 (c), pode-se verificar a presença de agregados celulares, onde os microorganismos encontram-se presos a uma matriz polimérica. A Figura 5.59 (d) mostra o biofilme em um estágio mais avançado com a presença de vários tipos morfológicos retidos na matriz polimérica..

As amostras coletadas no 10º dia do ciclo indicaram a predominância de cocos, segundo as análises de microscopia de contraste de fase (Figura 5.60 a, b). A presença de bacilos de extremidades afiladas, bacilos retos (Figura 5.60 a), filamentos (Figura 5.60 d), e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.60 c) também foi constatada. Bacilos e cocos fluorescentes também foram identificados, provavelmente pertencentes aos gêneros *Methanobacterium*, *Methanococcus* e *Methanobrevibacter*.

As análises de microscopia eletrônica de varredura apresentaram a predominância de cocos (Figura 5.60 e, f, h). Bacilos e vibrios (Figura 5.60 g) também foram encontrados aderidos à espuma.

Em vários campos observados, constatou-se uma grande quantidade de polímero extracelular recobrando o biofilme. Esta constatação vem de encontro com os gráficos de produção de polímeros extracelulares (Figuras 5.14 e 5.15) que apontam o 10º dia de ciclo como sendo o dia em que a concentração máxima de polímero excretado, na forma de polissacarídeos e polipeptídios, foi atingida.

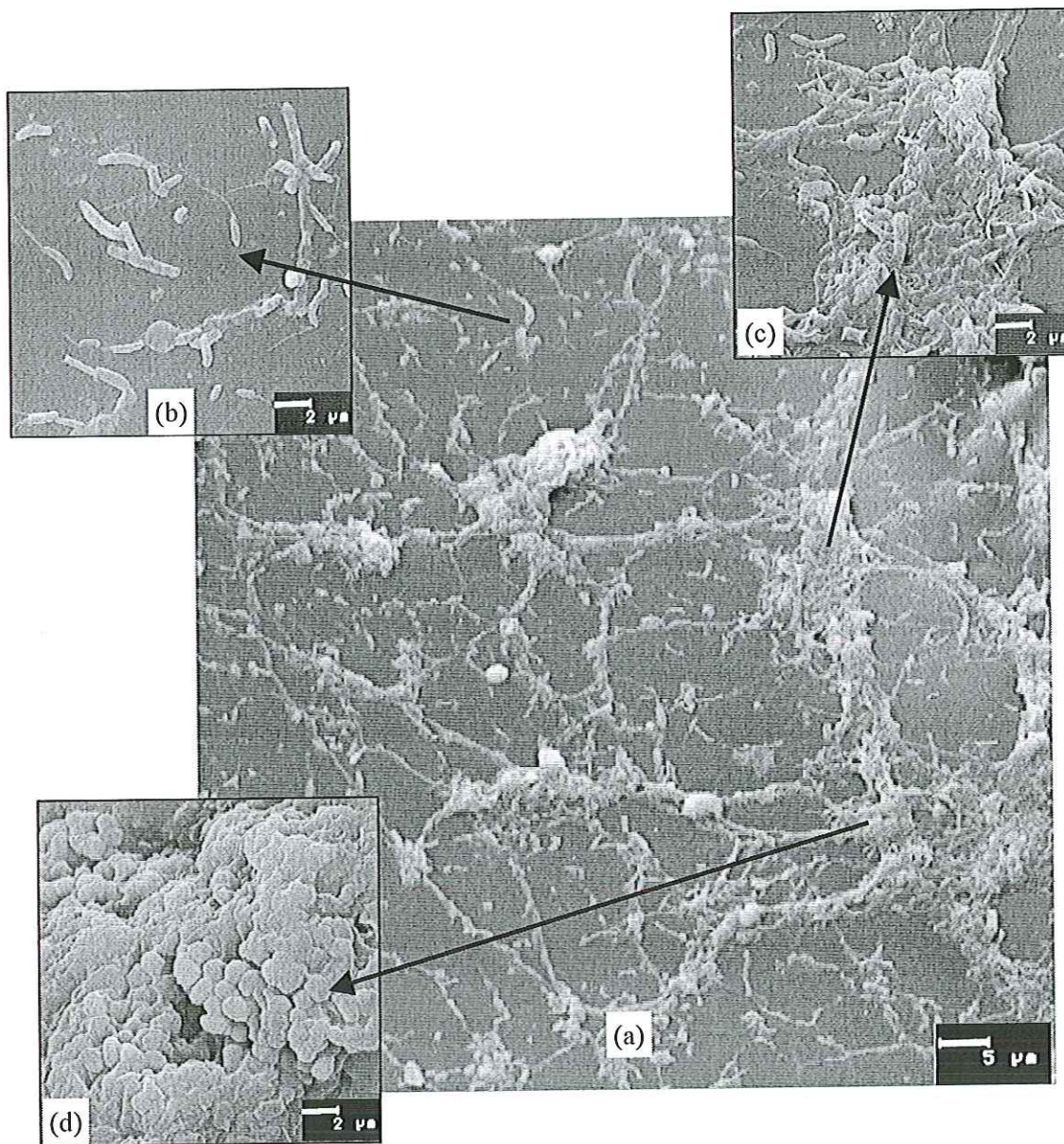


Figura 5.59: Observações sob microscopia eletrônica de varredura da fase inicial de colonização da espuma para os reatores provenientes do ciclo utilizando amido como substrato: (a) visão geral da colonização da espuma; (b) aderência inicial e fixação das células; (c) formação de agregados celulares; (d) biofilme.

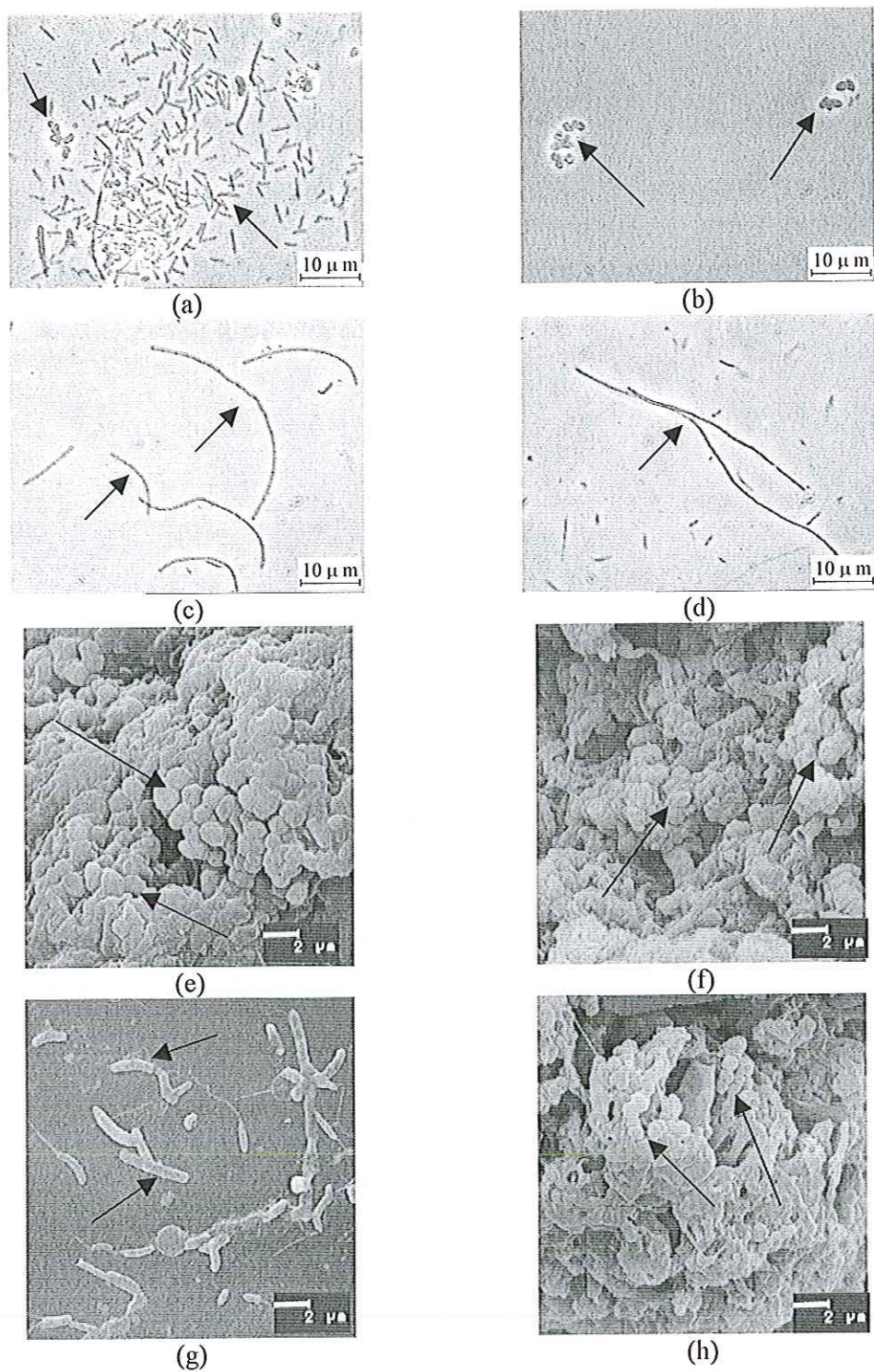


Figura 5.60: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 10º dia do ciclo, utilizando amido como substrato: (a) bacilos e cocos; (b) cocos; (c) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (d) fialmentos; (e), (f) e (h) cocos; (g) bacilos e vibrios.

5.6.4. - 13º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato

Segundo as análises de microscopia de contraste de fase, observou-se a predominância de cocos (Figura 5.61 b, c) e filamentos (Figura 5.61 a). Verificou-se também a presença de bacilos de extremidades arredondadas (Figura 5.61 d) e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. Bacilos e cocos fluorescentes também foram visualizados.

A velocidade máxima de colonização das matrizes de poliuretano foi atingida no 13º dia de operação, segundo a Figura 5.10 e o valor apresentado na Tabela 5.12. Nesse dia, de acordo com as análises de microscopia eletrônica de varredura, cocos e filamentos (Figura 5.61 g) foram as morfologias predominantes. A grande ocorrência de bacilos (Figura 5.61 e, f) também foi observada, além da presença de microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.61 h).

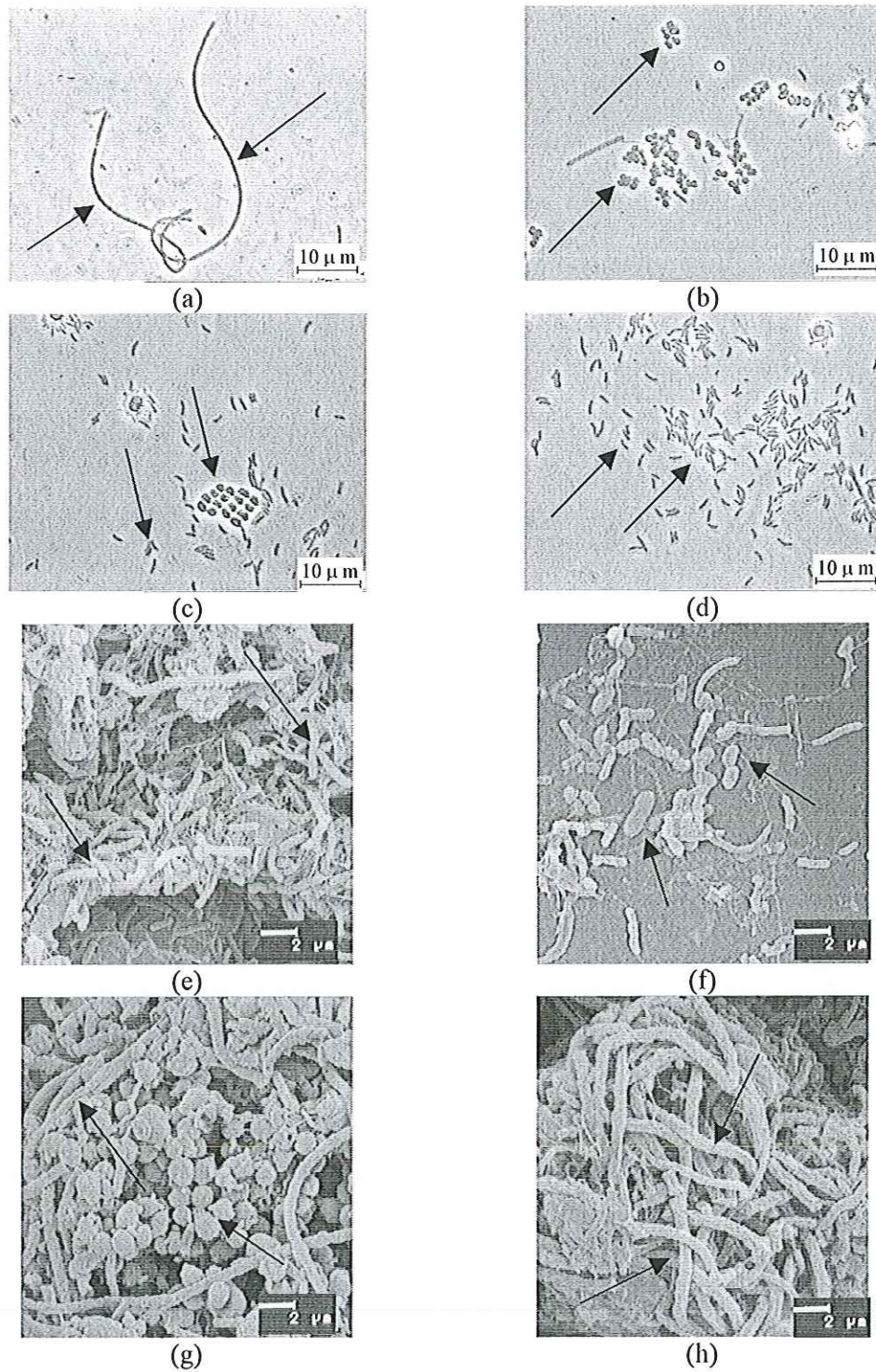


Figura 5.61: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 13º dia do ciclo, utilizando amido como substrato: (a) filamentos; (b) e (c) cocos; (d) bacilose vibrios; (e) e (f) bacilos; (g) cocos e filamentos; (h) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp.

5.6.5. - 16º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato

No 16º dia de operação houve uma diminuição sensível da ocorrência de cocos (Figura 5.62 d) e bacilos (Figura 5.62 d) nas amostras analisadas. Os filamentos (Figura 5.62 a, b) foram os microorganismos predominantes. Verificou-se também a presença de vibrios (Figura 5.62 g) e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. Vale ressaltar que bacilos e cocos fluorescentes apresentaram uma maior ocorrência (Figura 5.62 c).

As análises de microscopia eletrônica de varredura revelaram a predominância de cocos (Figura 5.62 f, h), filamentos (Figura 5.62 e, f) e organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.62 f). Bacilos, vibrios e espiroqueta foram observados nas regiões onde a colonização se encontrava em uma fase inicial (Figura 5.62 g).

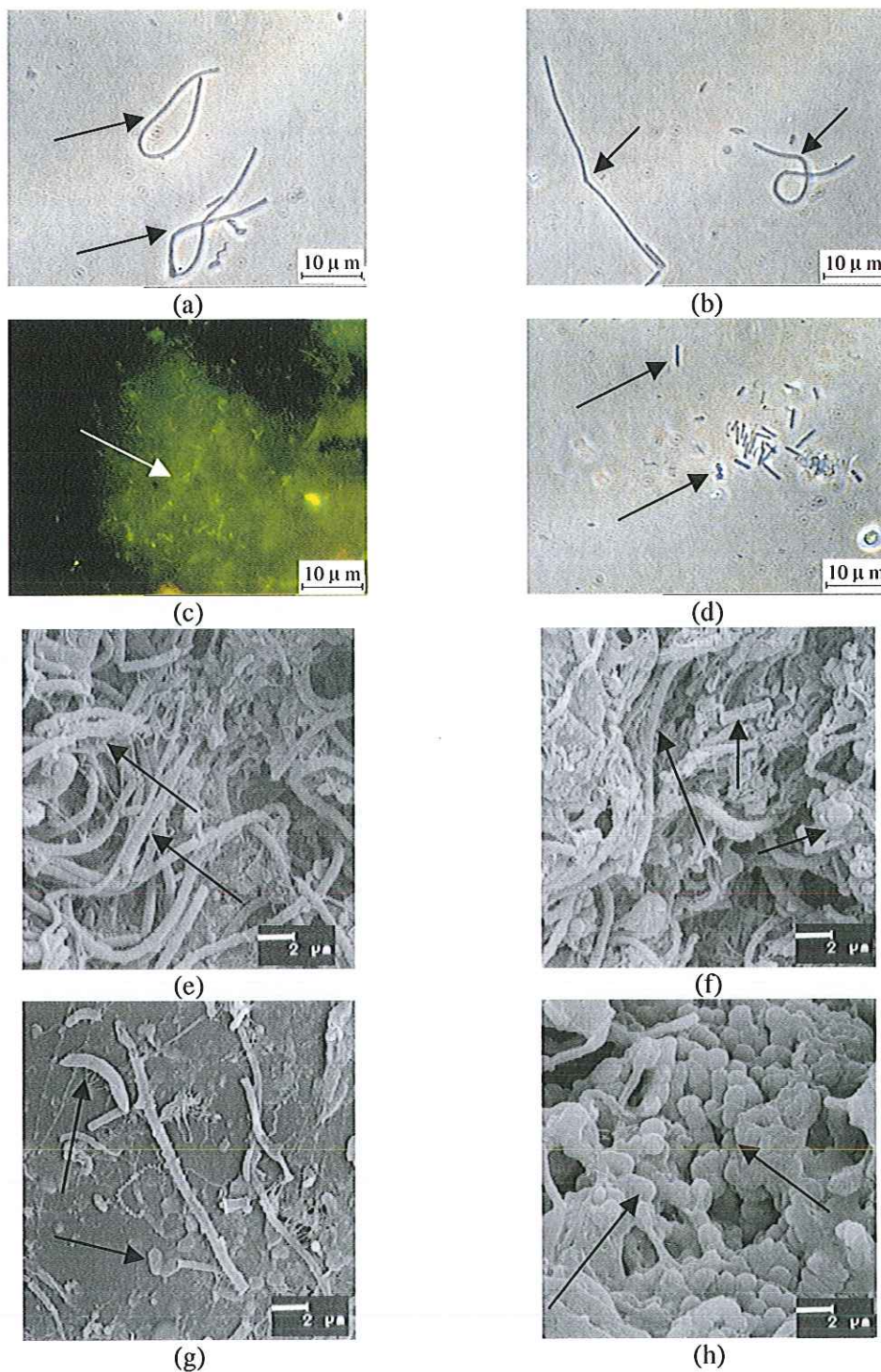


Figura 5.62: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 16º dia do ciclo, utilizando amido como substrato: (a) e (b) filamentos; (c) cocos e bacilos fluorescentes; (d) cocos e bacilos; (e) filamentos; (f) filamentos, cocos e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (g) bacilos e vibrios; (h) cocos.

5.6.6. - 21º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato

De acordo com as análises de microscopia de contraste de fase, as amostras referentes ao 21º dia apresentaram a predominância de cocos (Figura 5.64 d) e filamentos (Figura 5.64 b). A presença de bacilos também foi constatada (Figura 5.64 a). Bacilos e cocos fluorescentes apresentaram grande ocorrência (Figura 5.64 c).

Segundo as análises de microscopia eletrônica de varredura, as amostras apresentaram a predominância de filamentos aderidos à espuma (Figura 5.63 a, b) ou compondo o biofilme (Figura 5.64 e, g, h). A presença de cocos, bacilos (Figura 5.64 f, h), espiroqueta (Figura 5.64 f) e de microorganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp também foi verificada.

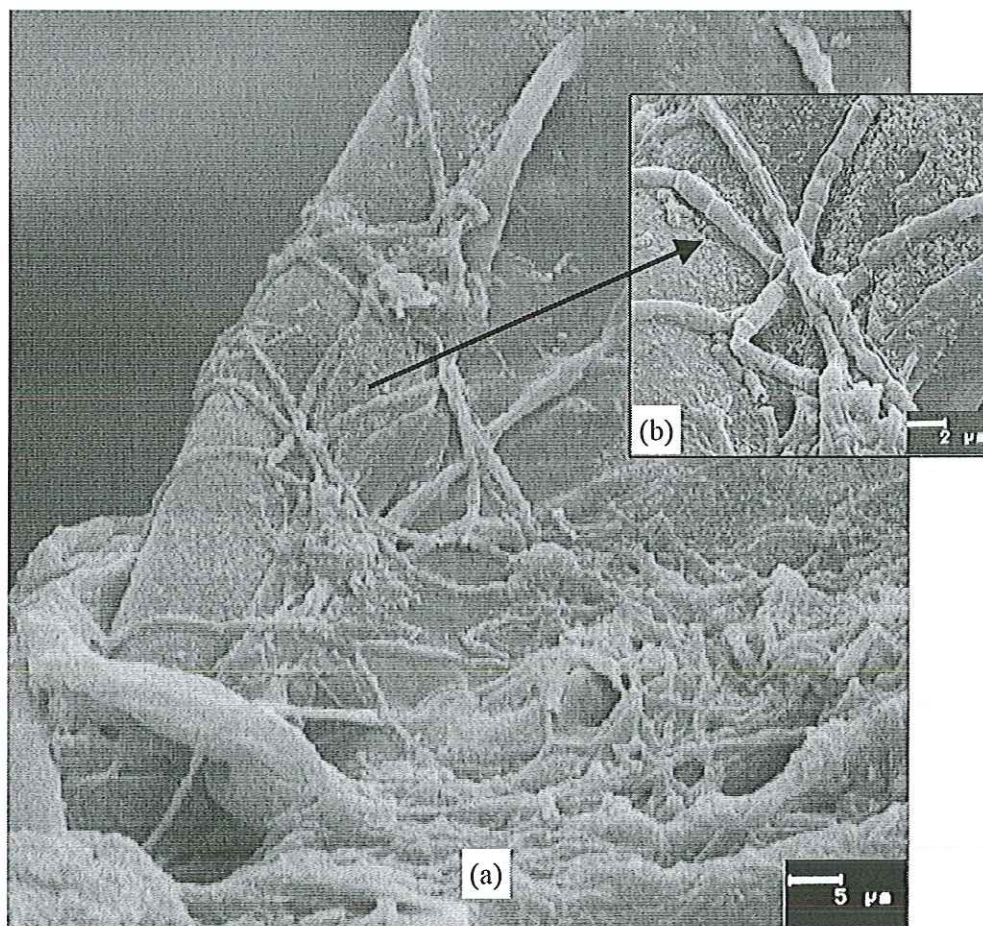


Figura 5.63: Observações sob microscopia eletrônica de varredura, referentes à colonização da espuma, para o ciclo utilizando amido como substrato: (a) visão geral da colonização da espuma; (b) filamentos aderidos à espuma.

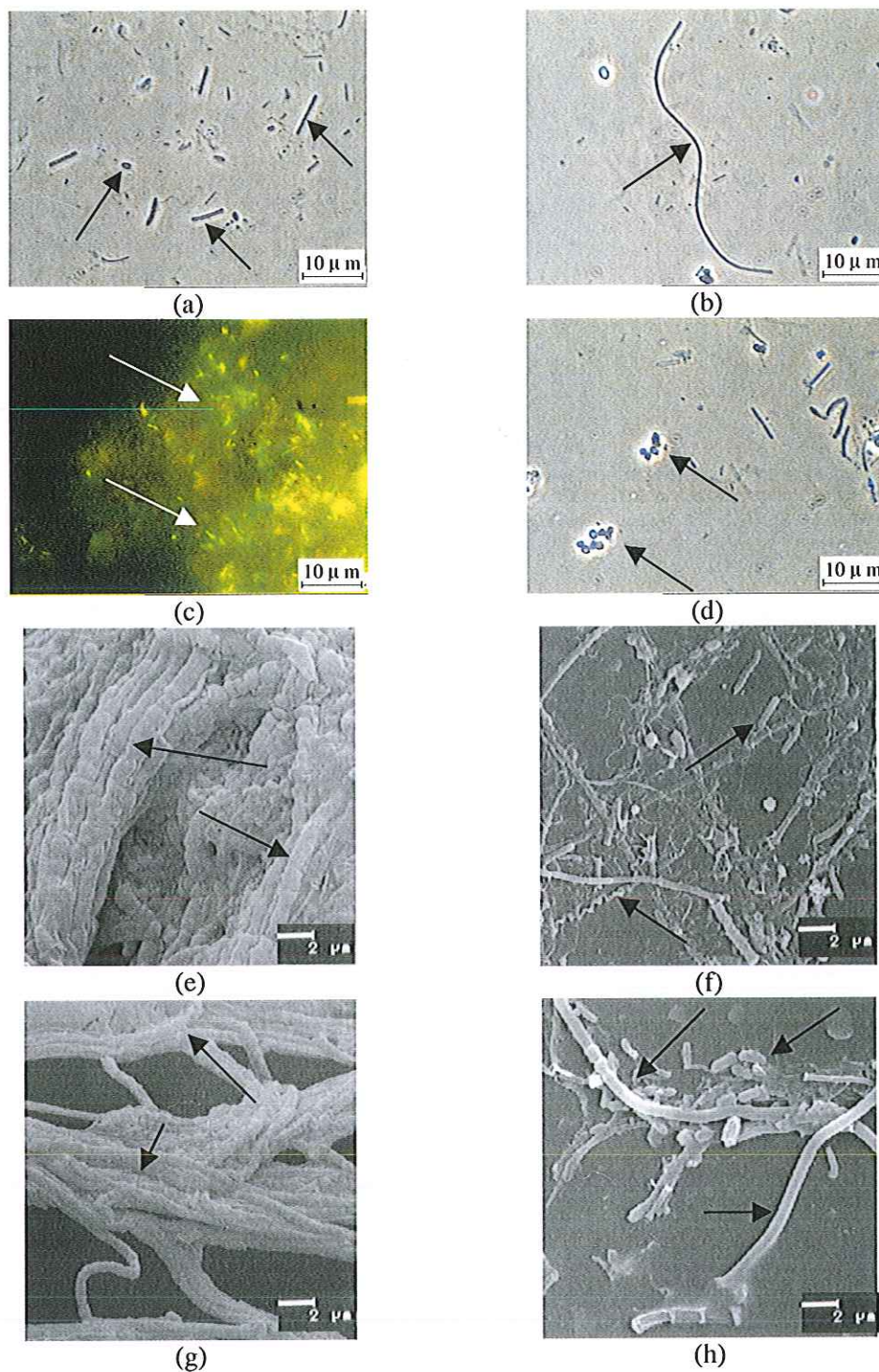


Figura 5.64: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 21º dia do ciclo, utilizando amido como substrato: (a) bacilos e cocos; (b) filamentos; (c) bacilos e cocos fluorescentes; (d) cocos; (e) filamentos; (f) espiroqueta e bacilos; (g) filamentos; (h) bacilos e filamentos.

5.6.7. - 24º dia de operação do ciclo utilizando amido como substrato

Ao final do ciclo alimentado com amido, observou-se a predominância de cocos (Figura 5.65 b, c) e vibrios (Figura 5.65 d) nas amostras analisadas. Verificou-se também a grande ocorrência de cocos e bacilos fluorescentes (Figura 5.65 a). Foi verificada a presença de filamentos (Figura 5.65 c) e de microorganismos semelhantes a *Methanosaetas* sp.

Nas análises de microscopia eletrônica de varredura constatou-se a predominância de cocos (Figura 5.65 f) e filamentos (Figura 5.65 e, g). A presença de bacilos (Figura 5.65 h) e de microorganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp foi verificada nas regiões onde a colonização se encontrava em uma fase inicial.

O modelo sigmoidal ajustado, referente à colonização das matrizes de poliuretano (Figura 5.5 e Tabela 5.8), indica a estabilização da concentração de biomassa a partir do 24º dia. Este resultado indica que o tempo de experimento utilizado estava de acordo com os objetivos propostos.

Portanto, no amido, diferentemente da glicose, não foi observada a presença de arranjos de cocos em tétrades e arqueas semelhantes a *Methanosarcina*. Neste ciclo ocorreu o predomínio de filamentos, cocos e cocos de extremidades arredondadas.

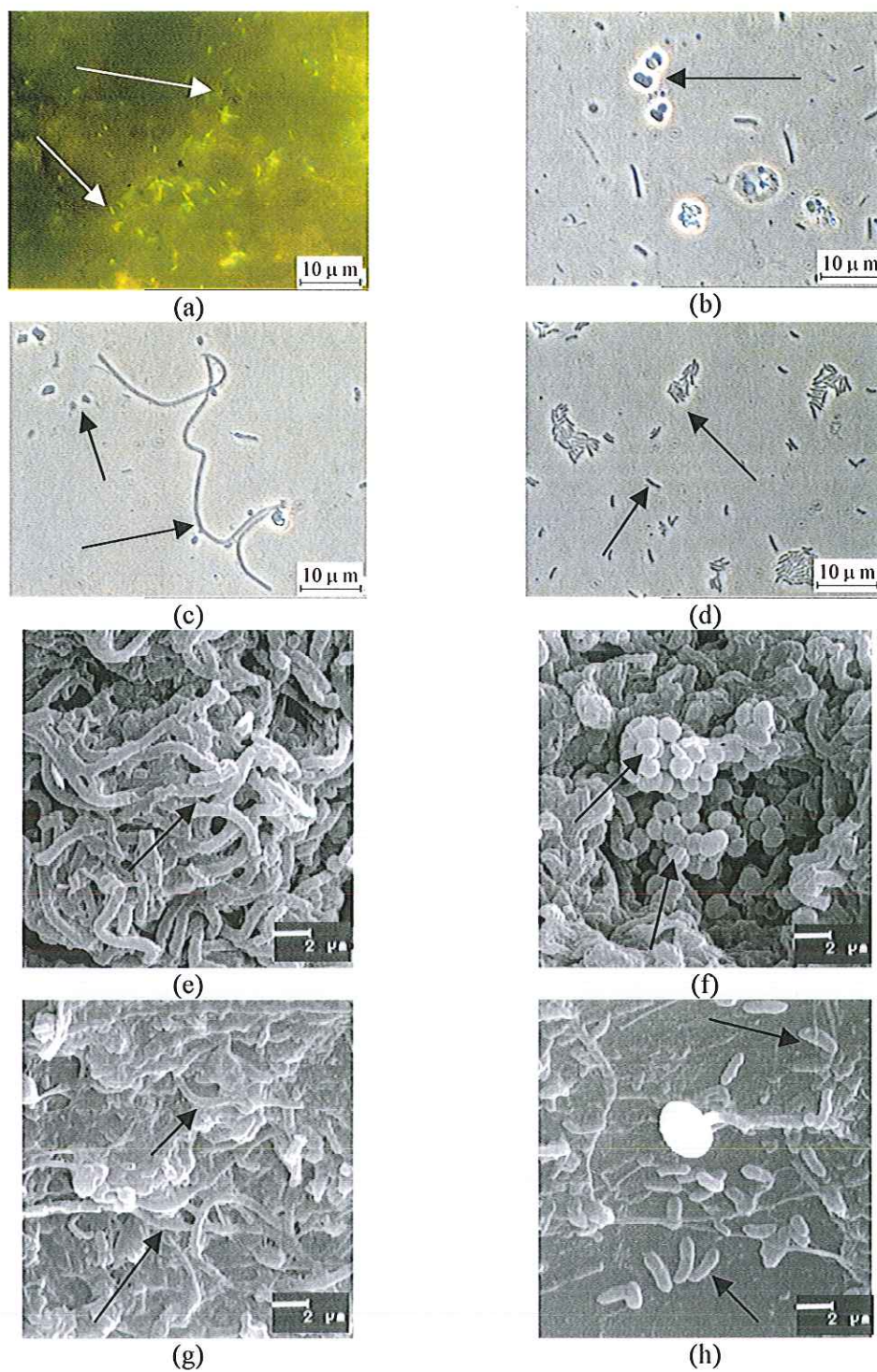


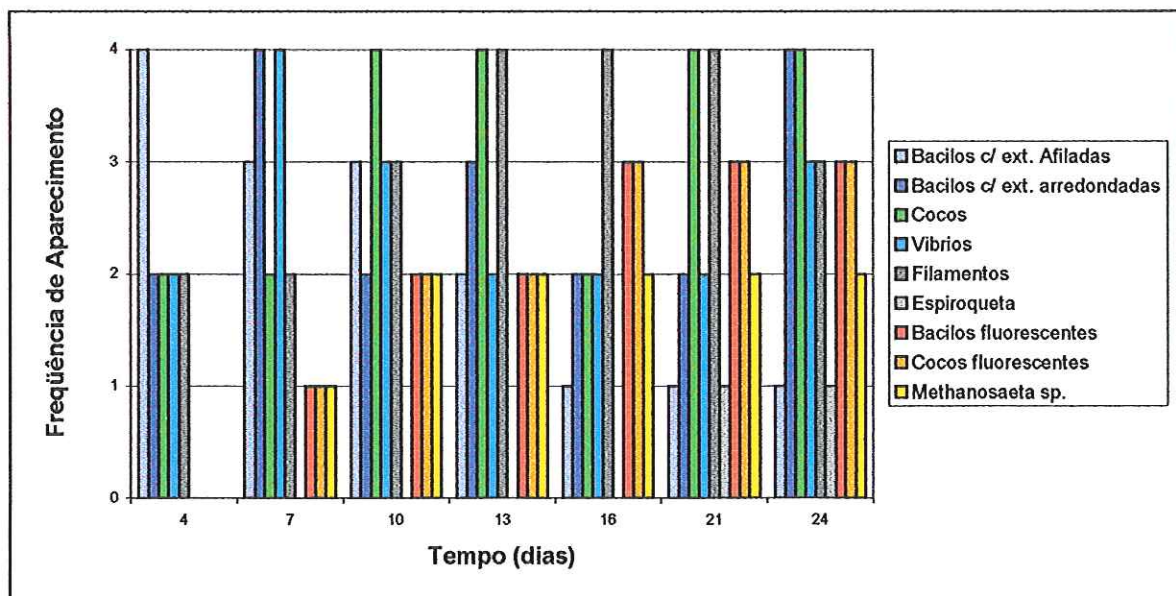
Figura 5.65: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 24º dia do ciclo, utilizando amido como substrato. (a) bacilos e cocos fluorescentes; (b) cocos; (c) cocos e filamentos; (d) vibrios; (e) filamentos; (f) cocos; (g) filamentos; (h) bacilos.

De modo a facilitar a visualização da seqüência morfológica dos microorganismos presentes nos reatores alimentados com amido, construiu-se uma tabela e um gráfico contendo a relação das morfologias observadas nos dias amostrados (Tabela 5.36; Figura 5.66). Na quantificação dos microorganismos, procurou-se percorrer o maior número de campos possíveis, anotando as morfologias encontradas em cada campo.

Tabela 5.36: Morfologias dos microorganismos presentes nos reatores ao longo do ciclo alimentado com amido.

Morfologias	Amido						
	Tempo (dias)						
	4°	7°	10°	13°	16°	21°	24°
Bacilos com extremidades afiladas	++++	+++	+++	++	+	+	+
Espiroqueta	-	-	-	-	-	+	+
Filamentos	++	++	+++	++++	++++	++++	+++
Bacilos Fluorescentes	-	+	++	++	+++	+++	+++
Cocos fluorescentes	-	+	++	++	+++	+++	+++
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	+	++	++	++	++	++
Vibrios	++	++++	+++	++	++	++	+++
Cocos	++	++	++++	++++	++	++++	++++
Bacilos com extremidades arredondadas	++	++++	++	+++	++	++	++++

(++++) Predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (-) não foram encontrados.



Frequência de Aparecimento: (4) Predominantes; (3) frequentes; (2) pouco frequentes; (1) raros; (0) não foram encontrados.

Figura 5.66: Frequência de aparecimento das morfologias, ao longo do tempo, para o ciclo utilizando amido como substrato.

5.7 Dinâmica de colonização do biofilme anaeróbio em matrizes de poliuretano em reatores utilizando óleo de soja como substrato

O ciclo utilizando o óleo mostrou um comportamento diferenciado no processo de inicial de aderência com aumento gradual da biomassa aderida na espuma, podendo ser descrito segundo um modelo hiperbólico (Figura 5.6).

Ao longo de todo ciclo utilizando óleo de soja, vários campos da espuma foram analisados por microscopia eletrônica de varredura. Em muitos deles, verificou-se a existência de um filme recobrindo as células presentes na espuma (Figura 5.67 e). A formação deste filme, provavelmente, foi devido à adsorção de moléculas de óleo à biomassa aderida, modificando sua superfície, interferindo assim, no processo de aderência dos microorganismos. Isso pode explicar o comportamento distinto encontrado na colonização das matrizes de espuma para o ciclo utilizando óleo de soja como substrato.

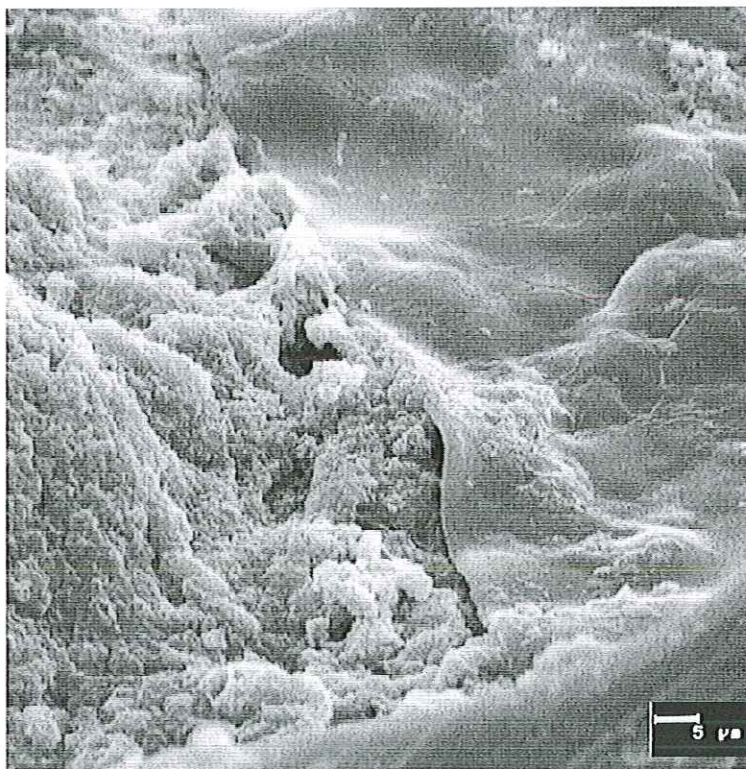


Figura 5.67: Camada de óleo de soja recobrindo o biofilme anaeróbio.

5.7.1. - 4º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato

Em ambientes anaeróbios, os lipídios são primeiramente hidrolisados pelas bactérias fermentativas, através da ação das lipases, proporcionando a liberação de ácidos graxos, glicerol e galactose entre outros produtos. Em seguida essas substâncias são degradadas anaerobiamente por vários microorganismos presentes no consórcio (MADIGAN et al., 2000).

As imagens de microscopia ótica revelaram a predominância de bacilos com extremidades arredondadas e vibrios (Figura 5.68 b ,c) nas amostras retiradas no 4º dia. Cocos (Figura 5.68 c) e microorganismos de morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp foram encontrados (Figura 5.68 d). Bacilos e cocos fluorescentes também foram observados (Figura 5.68 a).

As análises de microscopia de varredura mostraram a predominância de bacilos nas regiões onde a colonização da espuma encontrava-se em uma fase inicial (Figura 5.68 e, f, h). Foram encontrados vibrios aderidos à espuma (Figura 5.68 h), além de microorganismos de morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp aderidos sobre os bacilos (Figura 5.68 f). Nas regiões onde o biofilme já estava formado verificou-se a grande ocorrência de cocos (Figura 5.68 g).

De uma maneira geral, como nos ciclos que utilizaram glicose e amido na alimentação, foi observado que os bacilos (com extremidades arredondadas e retos) e os vibrios são os microorganismos precursores da formação do biofilme, sendo eles os maiores responsáveis pela aderência inicial e fixação às espumas de poliuretano.

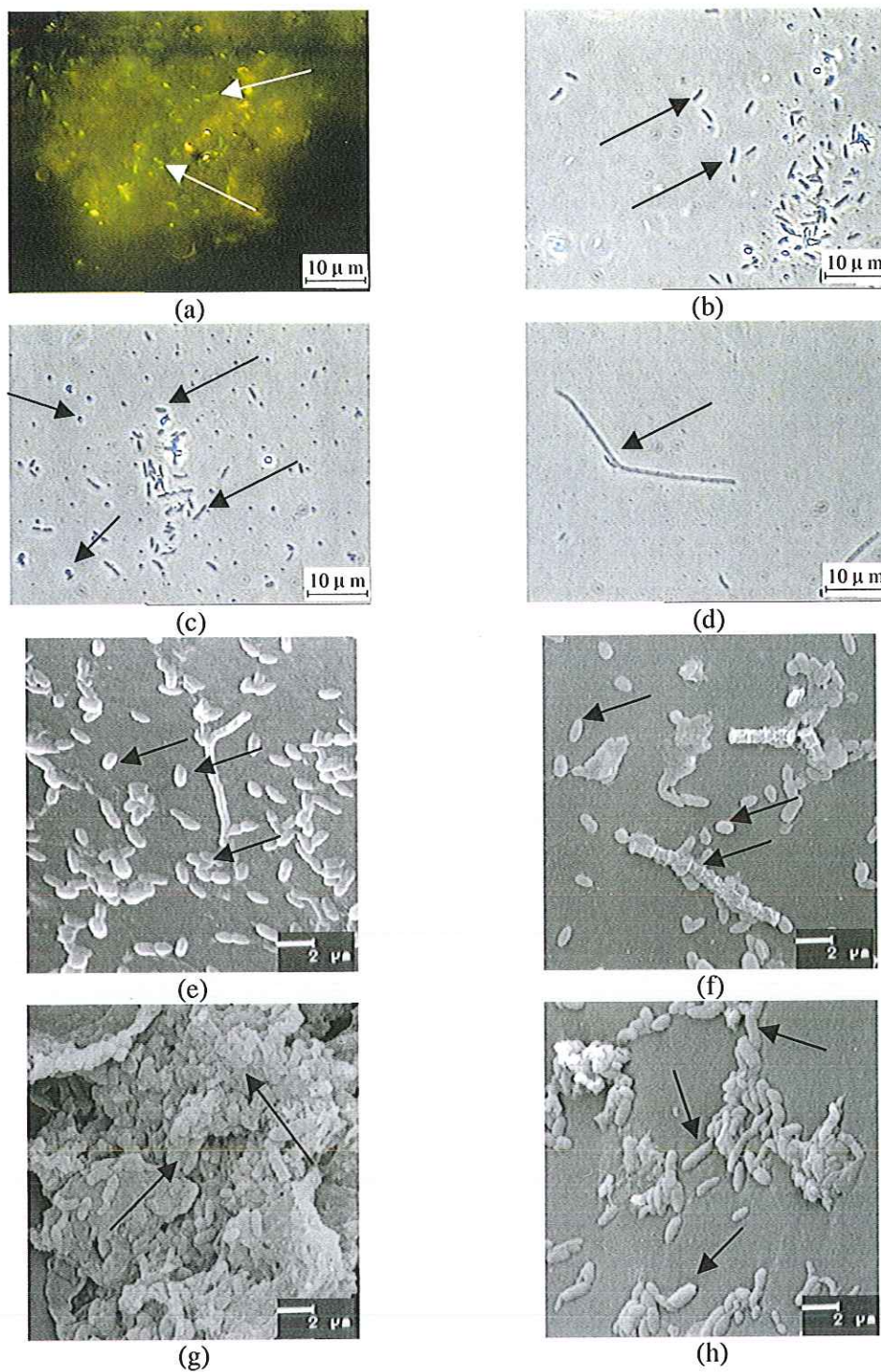


Figura 5.68: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 4º dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato: (a) Bacilos e cocos fluorescentes; (b) bacilos; (c) bacilos e cocos; (d) organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (e) e (g) bacilos; (f) bacilos e organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (h) vibrios e bacilos.

5.7.2. - 7º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato

As análises de microscopia ótica, referentes 7º dia de ciclo, revelaram a predominância de vibrios (Figura 5.69 c) e bacilos com extremidades arredondadas e bacilos com extremidades arredondadas (Figura 5.69 a, d). Cocos (Figura 5.69 c), filamentos e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp também foram encontrados. Bacilos e cocos fluorescentes foram observados, sendo provavelmente pertencentes aos gêneros *Methanobacterium*, *Methanococcus* e *Methanobrevibacter* (Figura 5.69 b).

De acordo com as análises de microscopia de varredura pode-se constatar que as morfologias encontradas no 7º dia de ciclo apresentaram-se distribuídas nas mesmas proporções que as descritas no 4º dia. A predominância de bacilos (Figura 5.69 e, f, g) e a presença de vibrios, cocos (Figura 5.69 h) e de microorganismos de morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp (Figura 5.69 g) também foram constatadas nas regiões onde as células se encontravam aderidas à espuma.

Nas regiões onde o biofilme já havia sido formado verificou-se a presença de cocos (Figura 5.69 h).

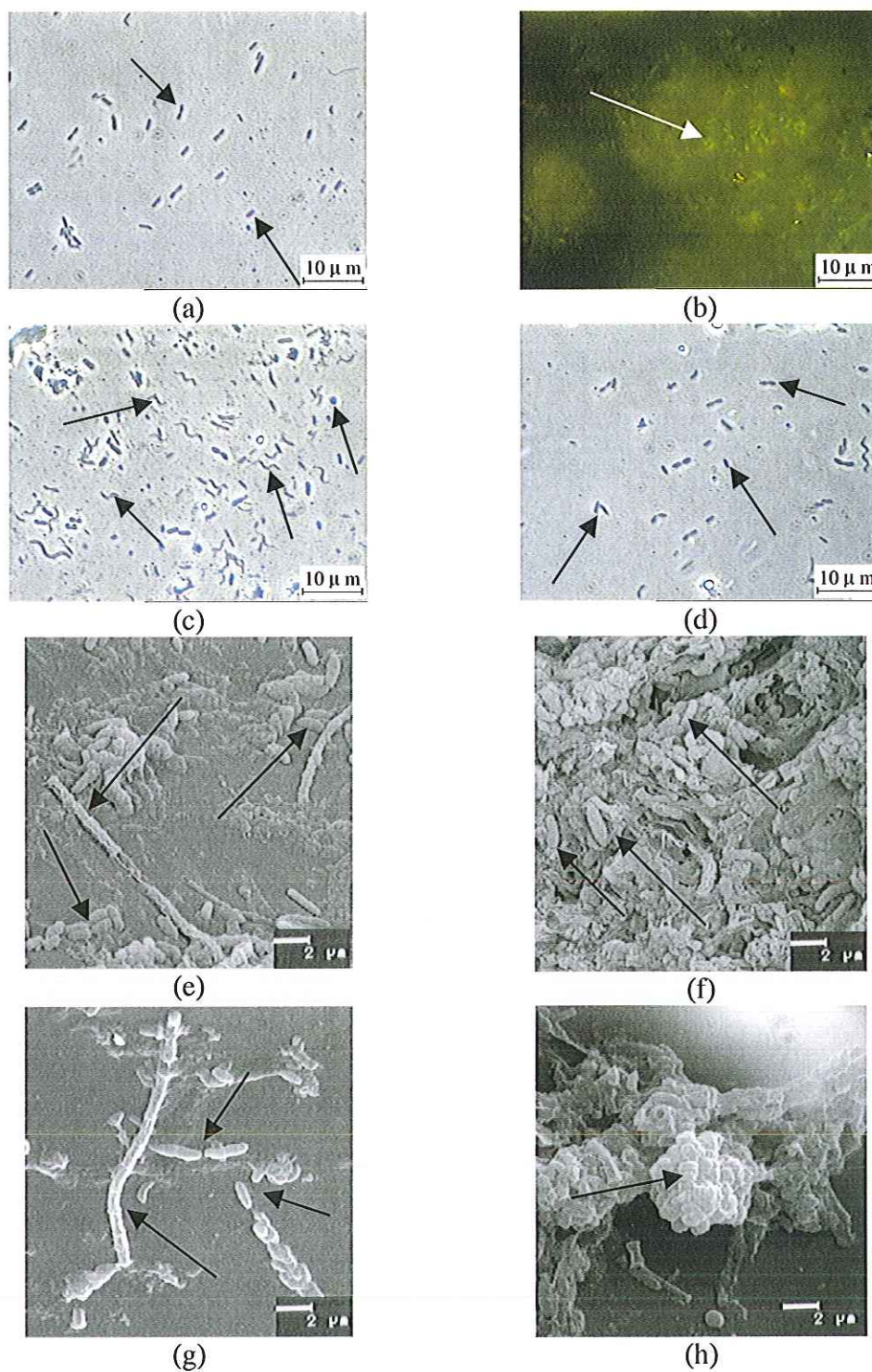


Figura 5.69: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 7º dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato: (a) bacilos; (b) bacilos e cocos fluorescentes; (c) vibrios e cocos; (d) bacilos; (f) bacilos; (e) e (g) bacilos e microorganismo semelhante ao gênero *Methanosaeta* sp; (h) cocos.

5.7.3. - 10º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato

As análises de microscopia ótica, referentes 10º dia de ciclo, revelaram a predominância de vibrios (Figura 5.70 a, b, c), bacilos com extremidades arredondadas (Figura 5.70 a, b, c) e coco-bacilos (Figura 5.70 a, b, c). Filamentos e microorganismos semelhantes às arqueas *Methanosaeta* sp também foram encontrados. Bacilos e cocos fluorescentes apresentaram grande ocorrência (Figura 5.70 d).

Vibrios (Figura 5.70 e, g, h) e bacilos (Figura 5.70 e, g, h) predominaram nas amostras referentes ao 10º dia de operação, segundo as análises de microscopia eletrônica de varredura. A ocorrência de cocos e microorganismos de morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp também foi verificada (Figura 5.70 f).

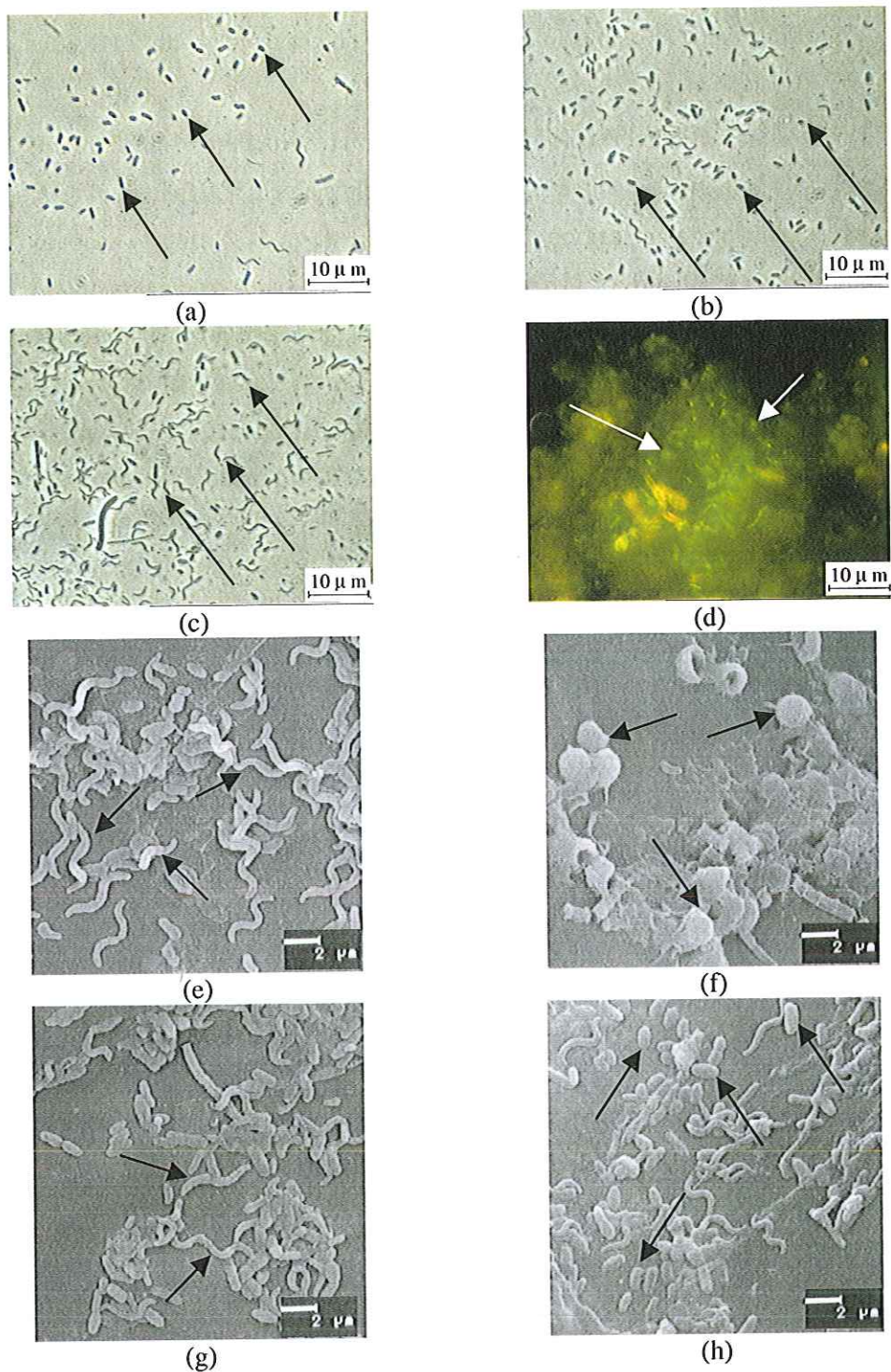


Figura 5.70: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 10º dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato: (a) bacilos com extremidades arredondadas; (b) cocos; (c) vibrios; (d) bacilos e cocos fluorescentes; (e) vibrios; (f) cocos; (g) vibrios; (h) bacilos.

5.7.4. - 13º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato

Um aumento significativo da ocorrência de vibrios (Figura 5.71 a, b) foi verificado nas amostras referentes 13º dia de ciclo. Bacilos de extremidades arredondadas (Figura 5.71 a, b, d) e cocos (Figura 5.71 a, c), filamentos e microorganismos semelhantes às arqueas *Methanosaeta* sp também foram encontrados (Figura 5.71 a). Bacilos e cocos fluorescentes apresentaram grande ocorrência (Figura 5.71 d).

As análises de microscopia eletrônica de varredura revelaram a predominância de vibrios nos campos amostrados (Figura 5.71 g). Bacilos (Figura 5.71 e, f) e cocos (Figura 5.71 h), espiroquetas (Figura 5.71 f), filamentos e microorganismos semelhantes a arqueas *Methanosaeta* sp também foram encontrados (Figura 5.71 g).

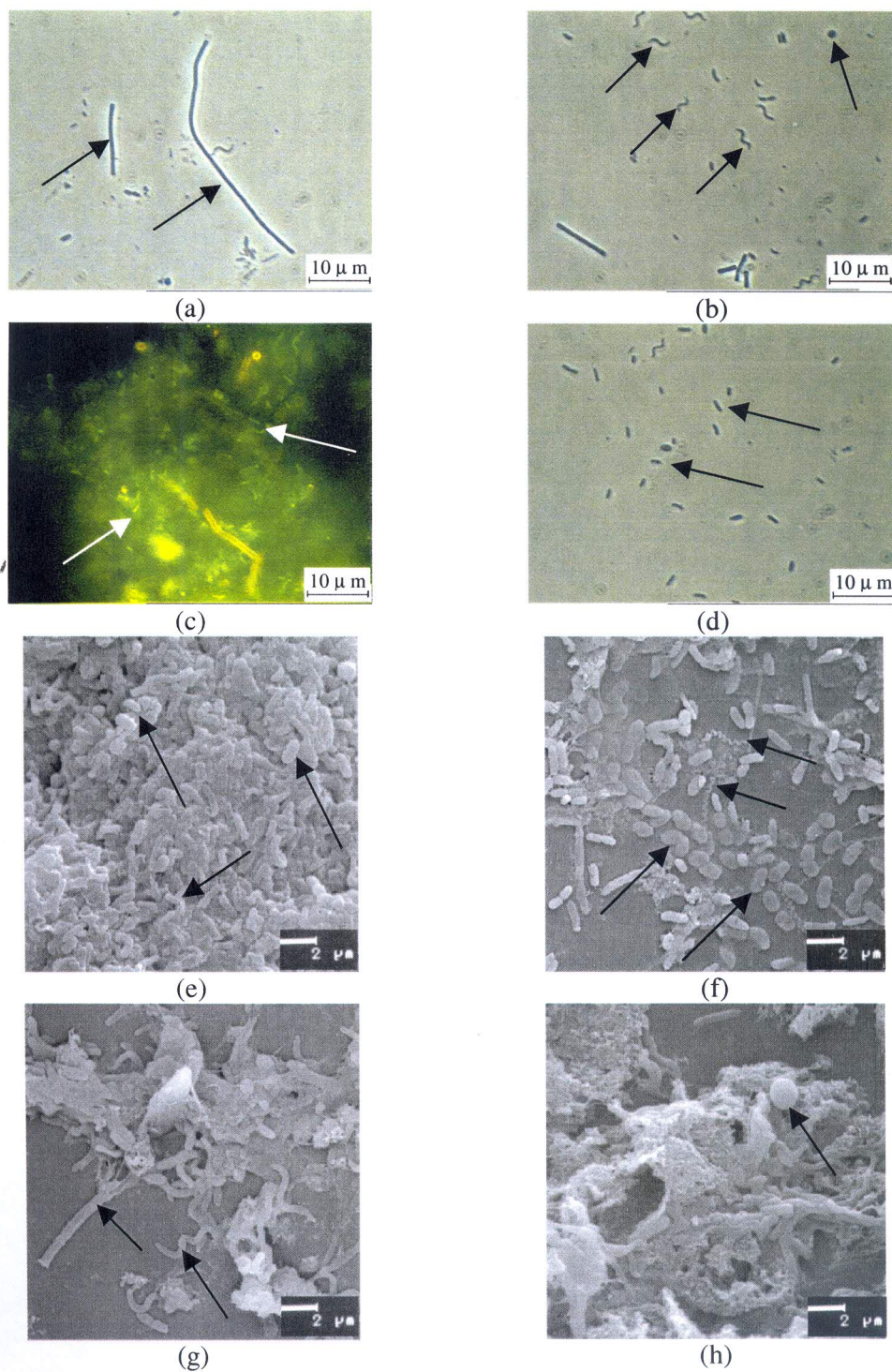


Figura 5.71: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 13^o dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato: (a) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (b) vibrios e cocos; (c) bacilos e cocos fluorescentes; (d) bacilos de extremidades arredondadas; (e) bacilos, (f) bacilos e espiroquetas; (g) vibrios e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (h) cocos.

5.7.5. - 16º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato

Segundo as análises de microscopia ótica, verificou-se a predominância de bacilos com as extremidades arredondas (Figura 5.72 b, d). Cocos (Figura 5.72 b, d), filamentos (Figura 5.72 c) e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.72 b) também foram encontrados. Bacilos e cocos fluorescentes apresentaram grande ocorrência (Figura 5.72 a).

Nas análises de microscopia eletrônica de varredura constatou-se a predominância de cocos (Figura 5.72 f, g) e bacilos (Figura 5.72 e). Espiroquetas e microorganismos semelhantes a arqueas *Methanosaeta* sp também foram identificados (Figura 5.72 h).

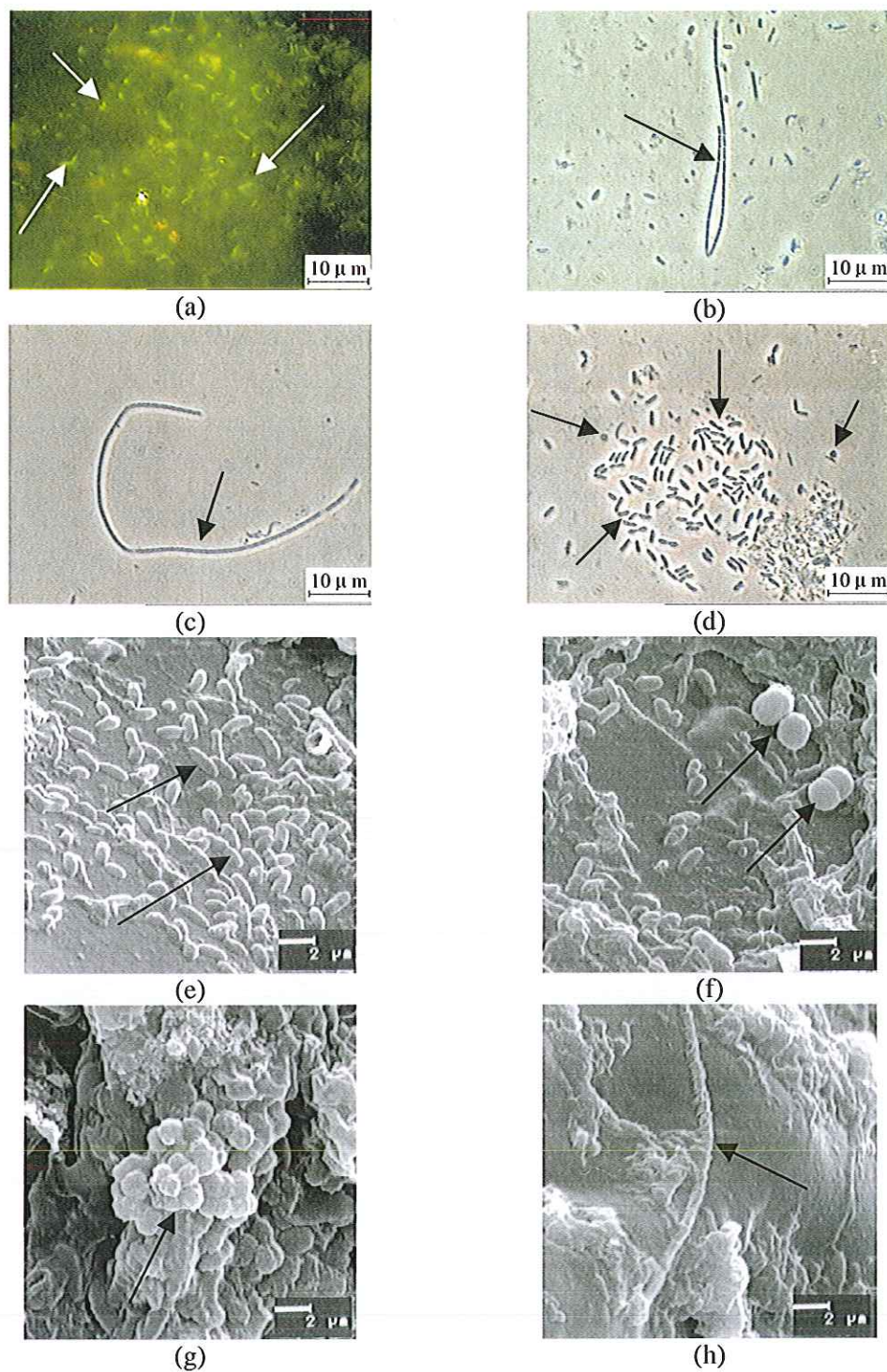


Figura 5.72: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 16º dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato: (a) bacilos e cocos fluorescentes; (b) e (h) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (c) filamentosos; (d) cocos e bacilos; (e) bacilos; (f) cocos; (g) cocos.

5.7.6. - 21º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato

As análises de microscopia ótica, referentes 21º dia de ciclo, revelaram a predominância bacilos, os quais foram encontrados em duas morfologias bem distintas. A morfologia predominante apresentava-se na forma de bacilos de extremidades arredondadas, já descritos anteriormente (Figura 5.73 c). A outra morfologia encontrada, era constituída de bacilos retos, os quais apresentavam dimensões maiores do que os anteriormente identificados (Figura 5.73 d). Uma maior ocorrência de filamentos foi constatada (Figura 5.73 b). Além disso, microorganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp foram encontrados. Bacilos e cocos fluorescentes apresentaram grande ocorrência (Figura 5.73 a).

Verificou-se a predominância de bacilos (Figura 5.73 e, f, g, h) nas amostras referentes ao 21º dia de operação, segundo as análises de microscopia eletrônica de varredura. Verificou-se também a presença de cocos (Figura 5.73 e) e a grande ocorrência de espiroquetas aderidos às espumas de poliuretano (Figura 5.73 g).

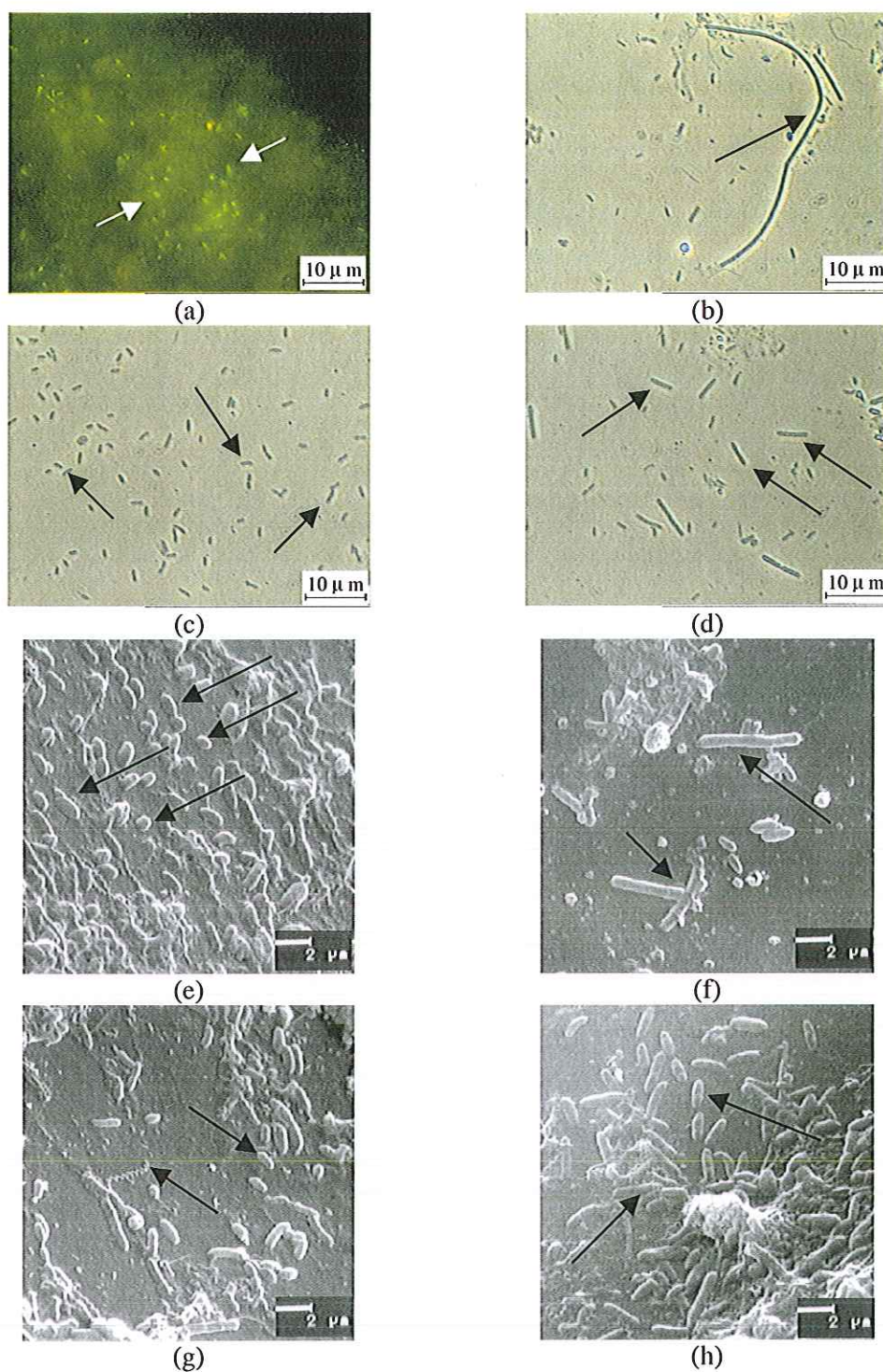


Figura 5.73: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 21º dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato: (a) bacilos e cocos fluorescentes; (b) filamentos; (c) bacilos de extremidades arredondadas; (d) bacilos; (e) cocos e bacilos; (f) bacilos maiores; (g) bacilos e espiroquetas; (h) bacilos.

5.7.7. -24º dia de operação do ciclo utilizando óleo de soja como substrato

No 24º dia de ciclo, segundo as análises de microscopia ótica, ocorreu a predominância bacilos com extremidades arredondadas (Figura 5.74 b, c). Cocos (Figura 5.74 a) e filamentos também foram encontrados. Bacilos e cocos fluorescentes apresentaram grande ocorrência (Figura 5.74 d).

Da mesma maneira que nas amostras anteriores, os bacilos (Figura 5.74 e, f, g) predominaram nas amostras referentes ao 24º dia de operação de acordo com as análises de microscopia eletrônica de varredura. A presença de espiroquetas (Figura 5.74 g), cocos (Figura 5.74 e) e microorganismos semelhantes a *Methanosäeta* sp também foi constatada (Figura 5.74 h).

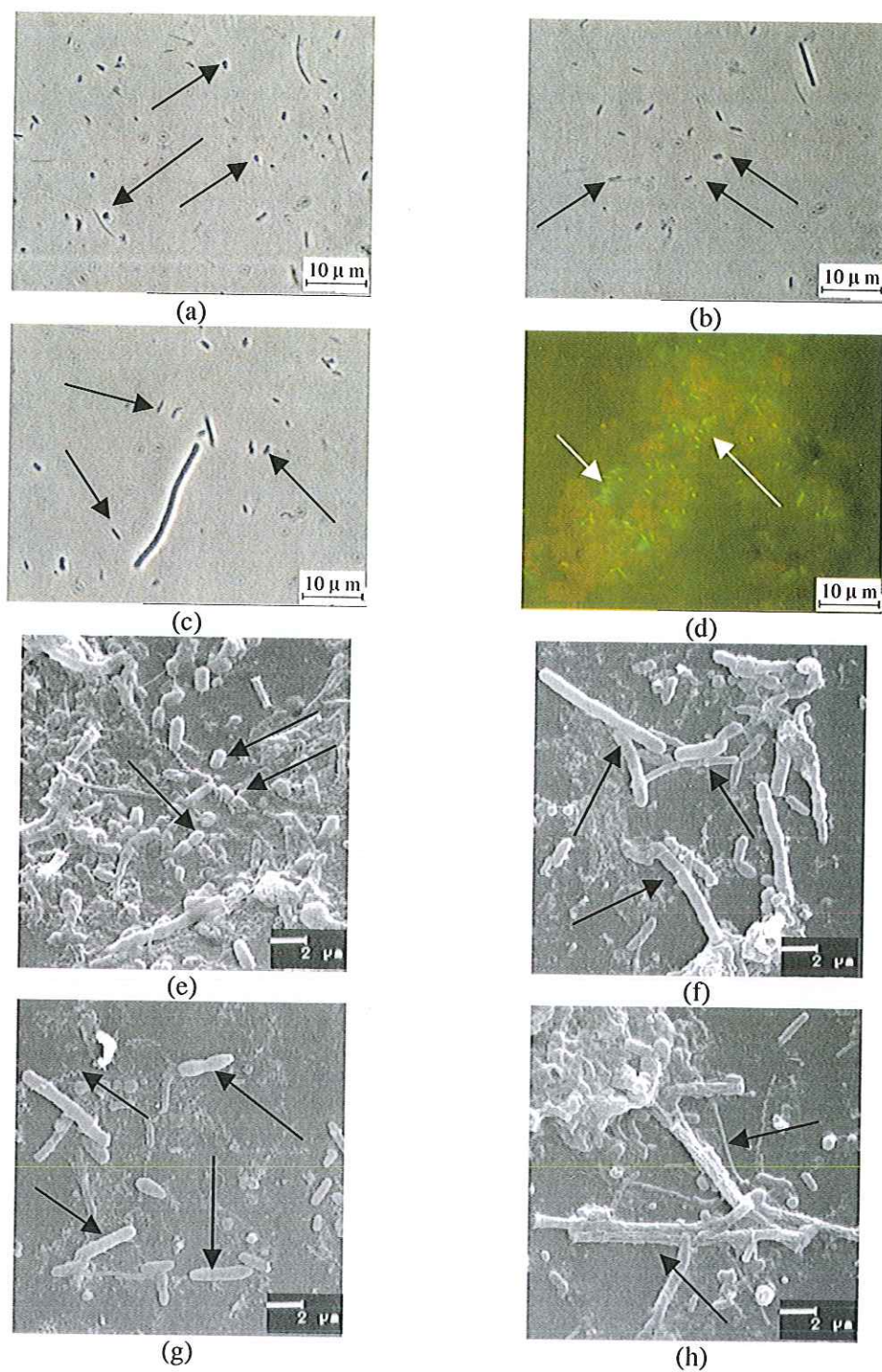


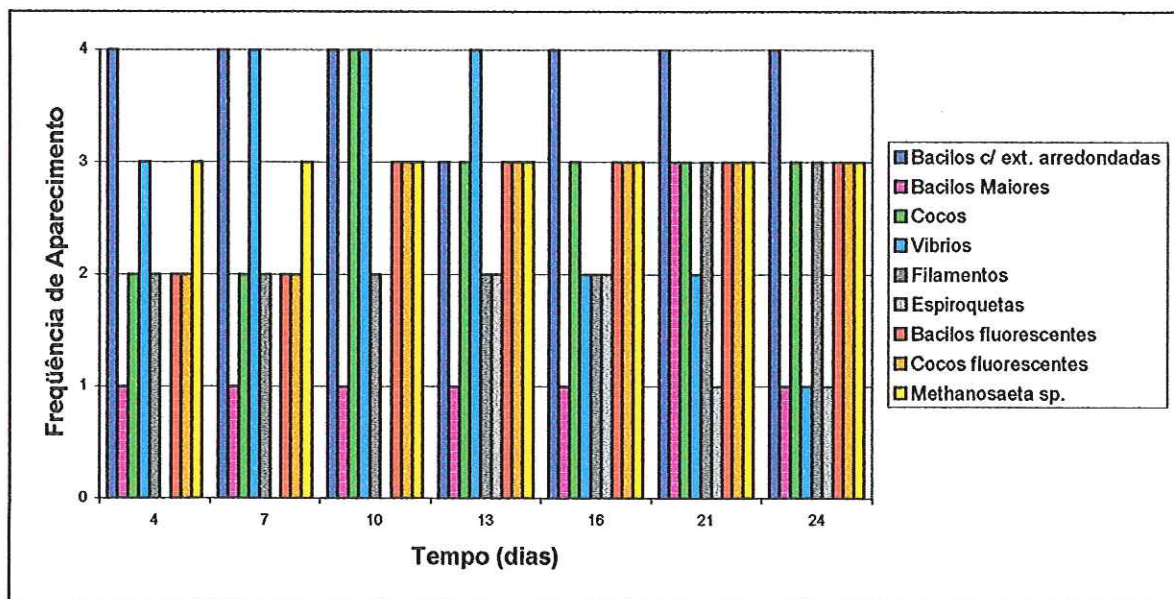
Figura 5.74: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 24º dia do ciclo, utilizando óleo de soja como substrato: (a) cocos; (b) e (c) bacilos; (d) bacilos e cocos fluorescentes; (e) cocos e bacilos; (f) e (g) bacilos; (h) microorganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp.

De modo a facilitar a visualização da seqüência morfológica dos microorganismos presentes nos reatores alimentados com óleo de soja, construiu-se uma Tabela e um gráfico contendo a relação das morfologias observadas nos dias amostrados (Tabela 5.37; Figura 5,75). Na quantificação dos microorganismos, procurou-se percorrer o maior número de campos possíveis, anotando as morfologias encontradas em cada campo.

Tabela 5.37: Morfologias dos microorganismos presentes nos reatores ao longo do ciclo alimentado com óleo de soja.

		Óleo de soja						
		Tempo (dias)						
Morfologias		4°	7°	10°	13°	16°	21°	24°
Bacilos	com	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++
extremidades arredondadas								
Espiroquetas		-	-	-	++	++	+	+
Filamentos		++	++	++	++	++	+++	+++
Bacilos Fluorescentes		++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Cocos fluorescentes		++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Methanosaeta sp.		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Vibrios		+++	++++	++++	++++	++	++	+
Cocos		++	+++	++++	+++	+++	+++	+++
Bacilos maiores		+	+	+	+	+	+++	+

(++++) Predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (-) não foram encontrados.



Frequência de Aparcimento: (4) Predominantes; (3) frequentes; (2) pouco frequentes; (1) raros; (0) não foram encontrados.

Figura 5.75: Frequência de aparecimento das morfologias, ao longo do tempo, para o ciclo utilizando óleo de soja como substrato.

5.8 Dinâmica de colonização do biofilme anaeróbio em matrizes de poliuretano em reatores utilizando extrato de carne como substrato

5.8.1. - 4º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato

O extrato de carne utilizado apresentava cerca de 63% de sua massa composta por proteínas. As proteínas presentes no extrato de carne foram quantificadas segundo o método de LOWRY modificado por PETERSON (1977), utilizando soro albumina bovina como padrão.

No processo anaeróbio, as proteínas são primeiramente hidrolisadas a peptídeos e aminoácidos os quais são fermentados a ácidos voláteis, CO_2 , H_2 , NH_4^+ , e S^{2-} por bactérias fermentativas. Estas bactérias podem metabolizar vários aminoácidos através de reações de oxi-redução (Reações de Stikland) onde um aminoácido funciona como doador de elétrons e o outro como aceptor, resultando na desaminação ou descarboxilação dos aminoácidos envolvidos (ATLAS, 1996).

As análises de microscopia ótica mostraram a predominância de bacilos com extremidades arredondadas nas amostras referentes ao 4º dia de ciclo (Figura 5.76 a, b, c, d). Estas bactérias podem estar provavelmente ligadas à hidrólise das proteínas ou então à fermentação anaeróbia dos aminoácidos. Bacilos de dimensões maiores apresentaram grande ocorrência (Figura 5.76 d). Verificou-se também a presença de filamentos, cocos e microorganismos de morfologia semelhante às arqueas do gênero *Methanosaeta* sp.

Através das análises de microscopia eletrônica de varredura, constatou-se a existência de colônias em um estado mais adiantado de desenvolvimento em várias regiões da espuma. Nestes agregados celulares, observou-se a presença de bacilos (Figura 5.76 h), cocos (Figura 5.76 e, g), filamentos (Figura 5.76 f) e microorganismos de morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp (Figura 5.76 g).

De maneira análoga ao ciclo alimentado com óleo de soja, os resultados de quantificação de polímeros também indicaram a maior produção específica de polímeros nos primeiros dias de operação do ciclo (Figuras 5.20 e 5.21).

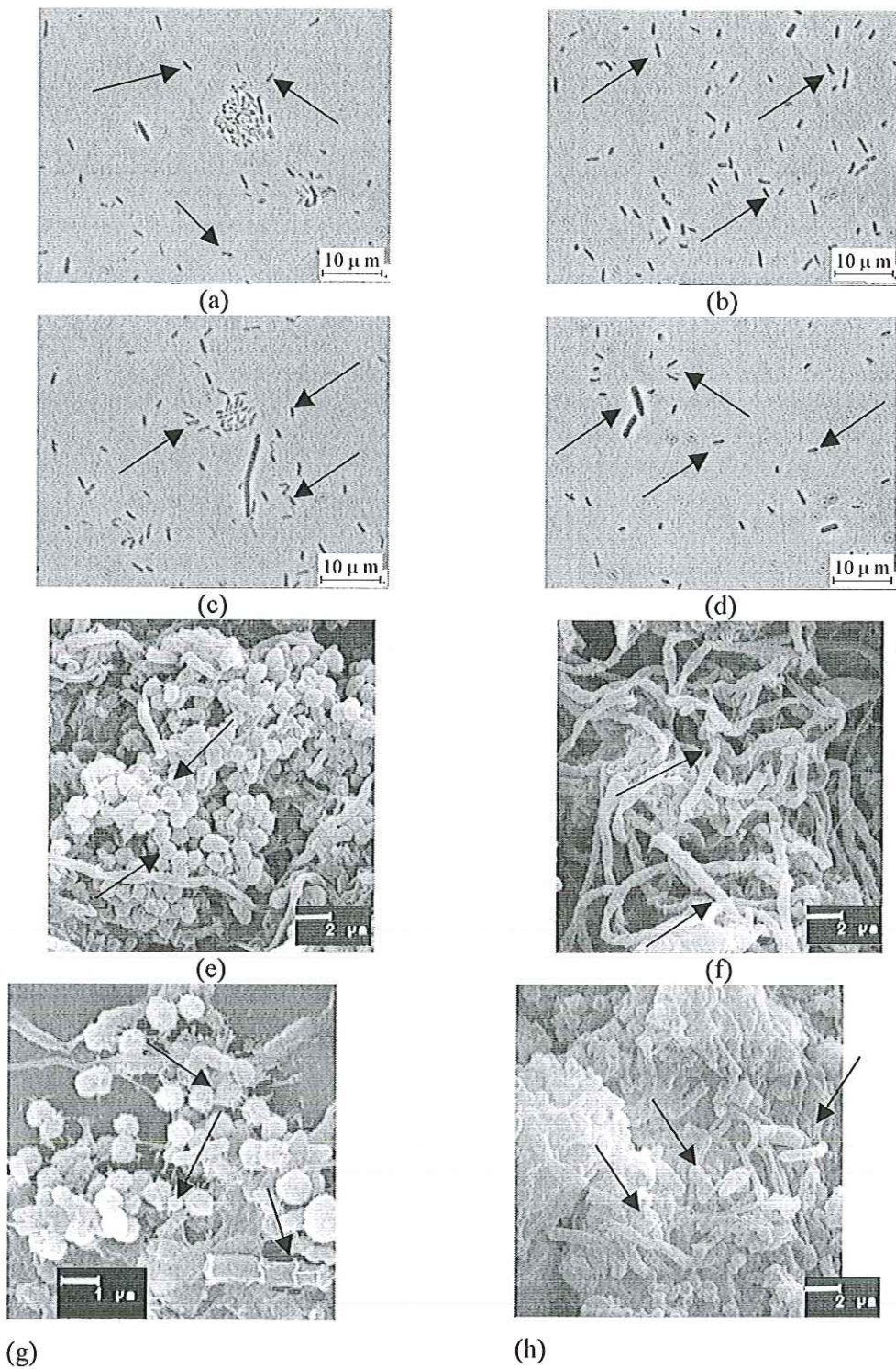


Figura 5.76: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 4º dia do ciclo, utilizando extrato de carne como substrato: (a) (b) e (c) bacilos; (d) bacilos com extremidades arredondadas e bacilos de maior dimensão; (e) cocos; (f) filamentos; (g) cocos e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (h) bacilos.

5.8.2. - 7º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato

As imagens de microscopia ótica revelaram a predominância de bacilos com extremidades arredondadas (Figura 5.77 a, b, d) e microorganismos de morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp. (Figura 5.77 b, c). A presença de cocos e filamentos também foi verificada.

De maneira análoga às análises sob microscopia ótica, as imagens de microscopia eletrônica de varredura apresentaram a predominância de bacilos com extremidades arredondadas (Figura 5.77 f, g, h) e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.77 e). Além disso, pode-se verificar que a colonização inicial, da mesma forma que nos ciclos anteriores, foi preferencialmente devido à aderência de bacilos (Figura 5.77 g, h).

È importante ressaltar que TOMMASO (1999), não verificou a presença de *Methanosaeta* sp em RAHLFd alimentados com gelatina. Neste trabalho, o predomínio celular foi devido exclusivamente a bacilos hidrogenotróficos.

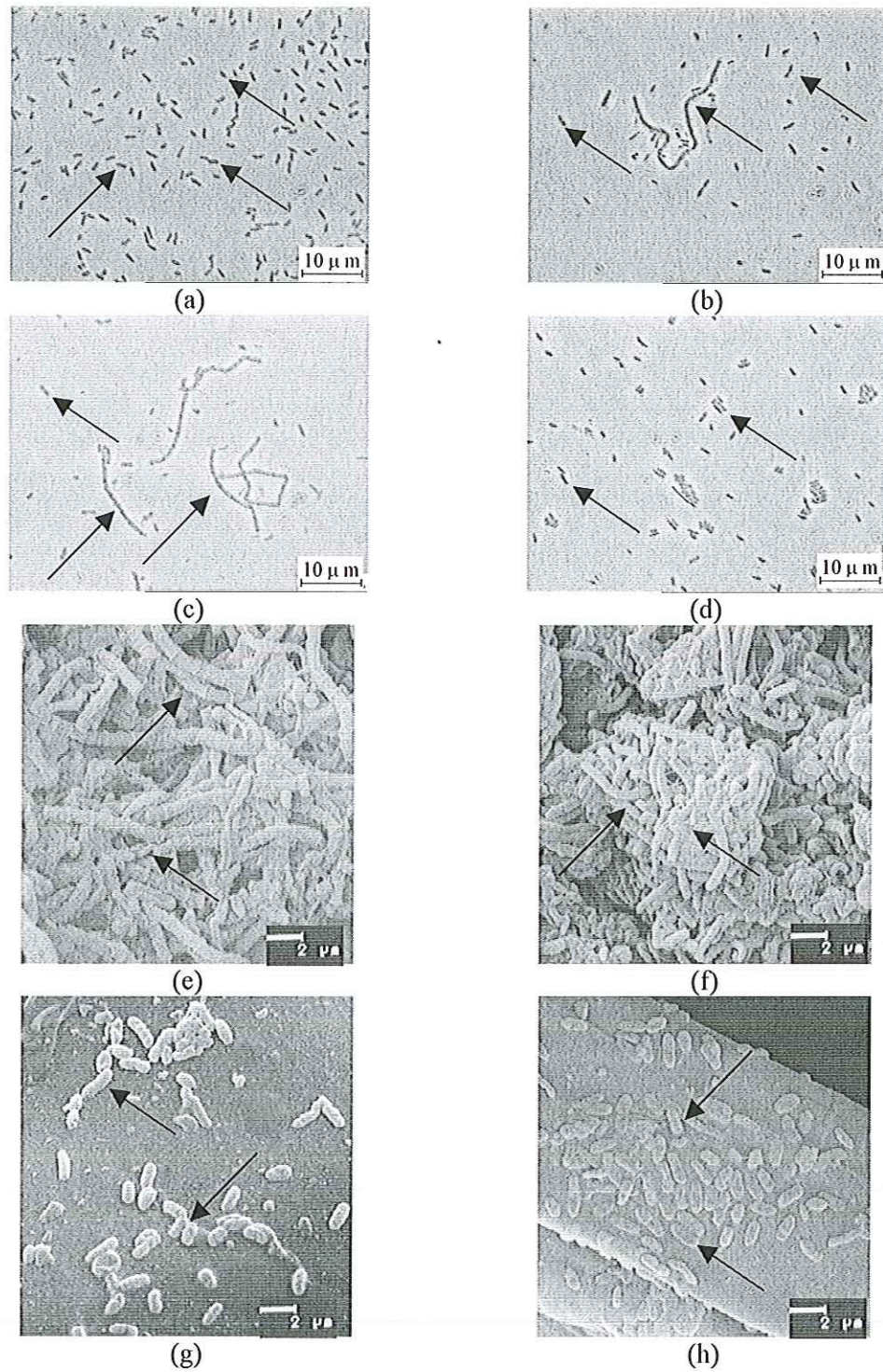


Figura 5.77: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 7º dia do ciclo, utilizando extrato de carne como substrato: (a) e (d) bacilos com extremidades arredondadas; (b) e (c) bacilos com extremidades arredondadas e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (e) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (f) bacilos; (g) e (h) bacilos com extremidades arredondadas.

5.8.3. - 10º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato

Nas amostras coletadas no 10º dia de operação do ciclo, verificou-se o aumento na ocorrência de cocos (Figura 5.78 a). As imagens de microscopia de contraste de fase revelaram ainda a predominância de bacilos com extremidades arredondadas (Figura 5.78 a) e microorganismos de morfologia semelhante ao gênero *Methanosaeta* sp (Figura 5.78 c). As análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram a predominância de cocos (Figura 5.78 f, g; Figura 5.78 c) e microorganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. (Figura 5.78 h).

A ocorrência de bacilos somente foi observada em regiões que se encontravam em um estágio inicial de colonização (Figura 5.78 e; Figura 5.79 b). A seqüência de colonização observada, na etapa alimentada com extrato de carne, foi muito semelhante às encontradas nos demais ciclos.

As análises de microscopia de epifluorescência realizadas mostraram a ocorrência de microorganismos de morfologia semelhante ao gênero *Methanosarcina* sp (Figura 5.78 d). Bacilos e cocos fluorescentes também foram identificados, provavelmente pertencentes aos gêneros *Methanobacterium*, *Methanococcus* e *Methanobrevibacter* (Figura 5.78 b).

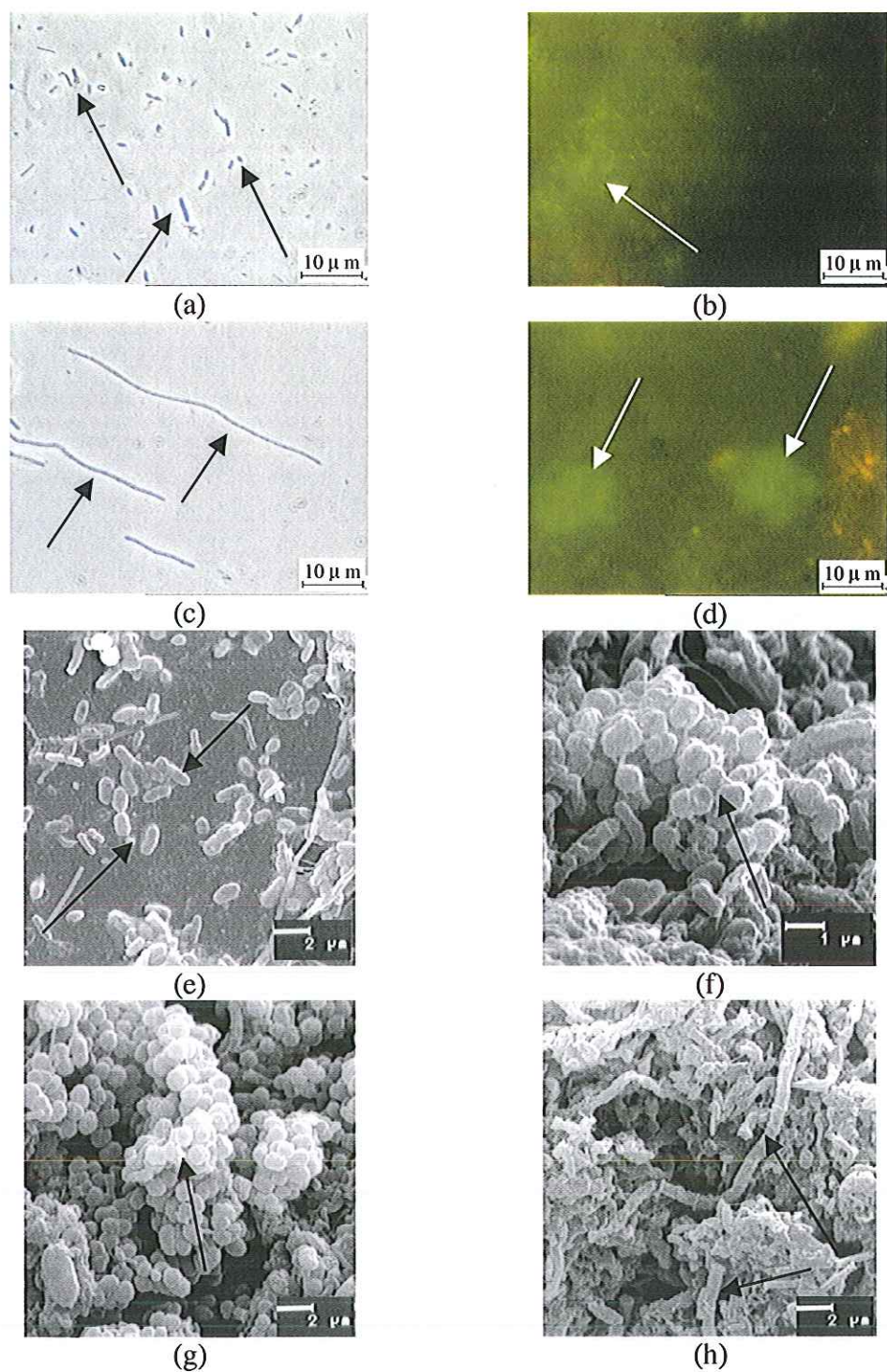


Figura 5.78: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 10º dia do ciclo, utilizando extrato de carne como substrato: (a) bacilos e cocos; (b) bacilos e cocos fluorescentes; (c) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (d) microorganismos semelhantes a *Methanosarcina* sp; (e) bacilos com extremidades arredondadas; (f) e (g) cocos; (h) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp.

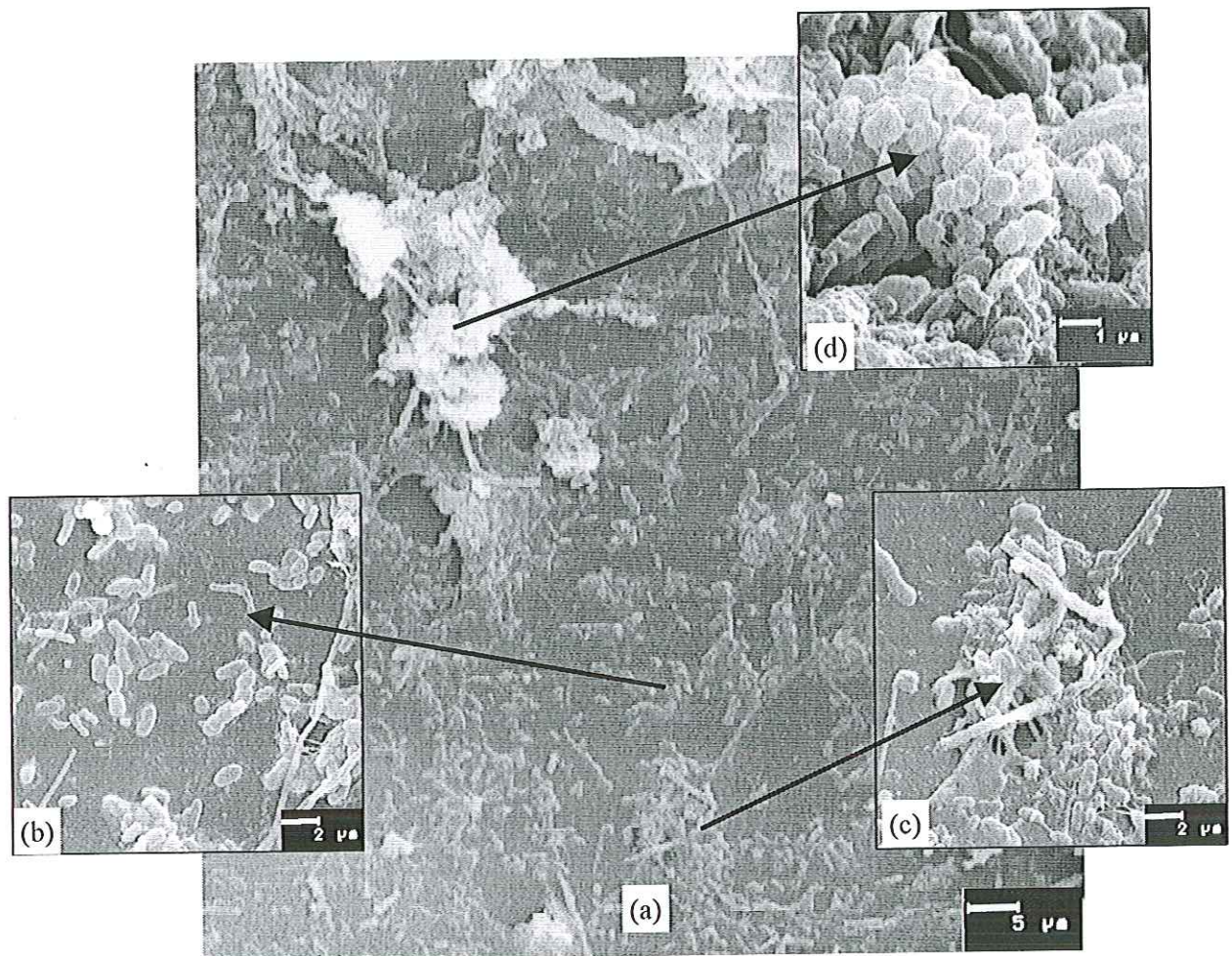


Figura 5.79: Observações sob microscopia eletrônica de varredura da fase inicial de colonização da espuma para os reatores provenientes do ciclo utilizando extrato de carne como substrato: (a) visão geral da colonização da espuma; (b) aderência inicial e fixação das células; (c) formação de microcolônias; (d) biofilme.

5.8.4. - 13º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato

As amostras coletadas no 13º dia de ciclo, segundo as análises de microscopia de contraste de fase, indicaram a predominância bacilos com extremidades arredondadas (Figura 5.80 d) e microorganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp (Figura 5.80 b), além da presença de coco-bacilos (Figura 5.80 a). Constatou-se a ocorrência de filamentos. Cocos e bacilos fluorescentes também foram identificados em vários campos observados (Figura 5.80 c).

As análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram a predominância de bacilos (Figura 5.80 e), cocos (Figura 5.80 f) e filamentos (Figura 5.80 g). A presença de microorganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp também foi verificada (Figura 5.80 h).

Segundo a Figura 5.10 e de acordo com o valor apresentado na Tabela 5.12, verificou-se que a velocidade máxima de colonização foi atingida no 14º dia para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato. Esse resultado foi semelhante aos encontrados nos ciclo utilizando glicose e amido como substrato.

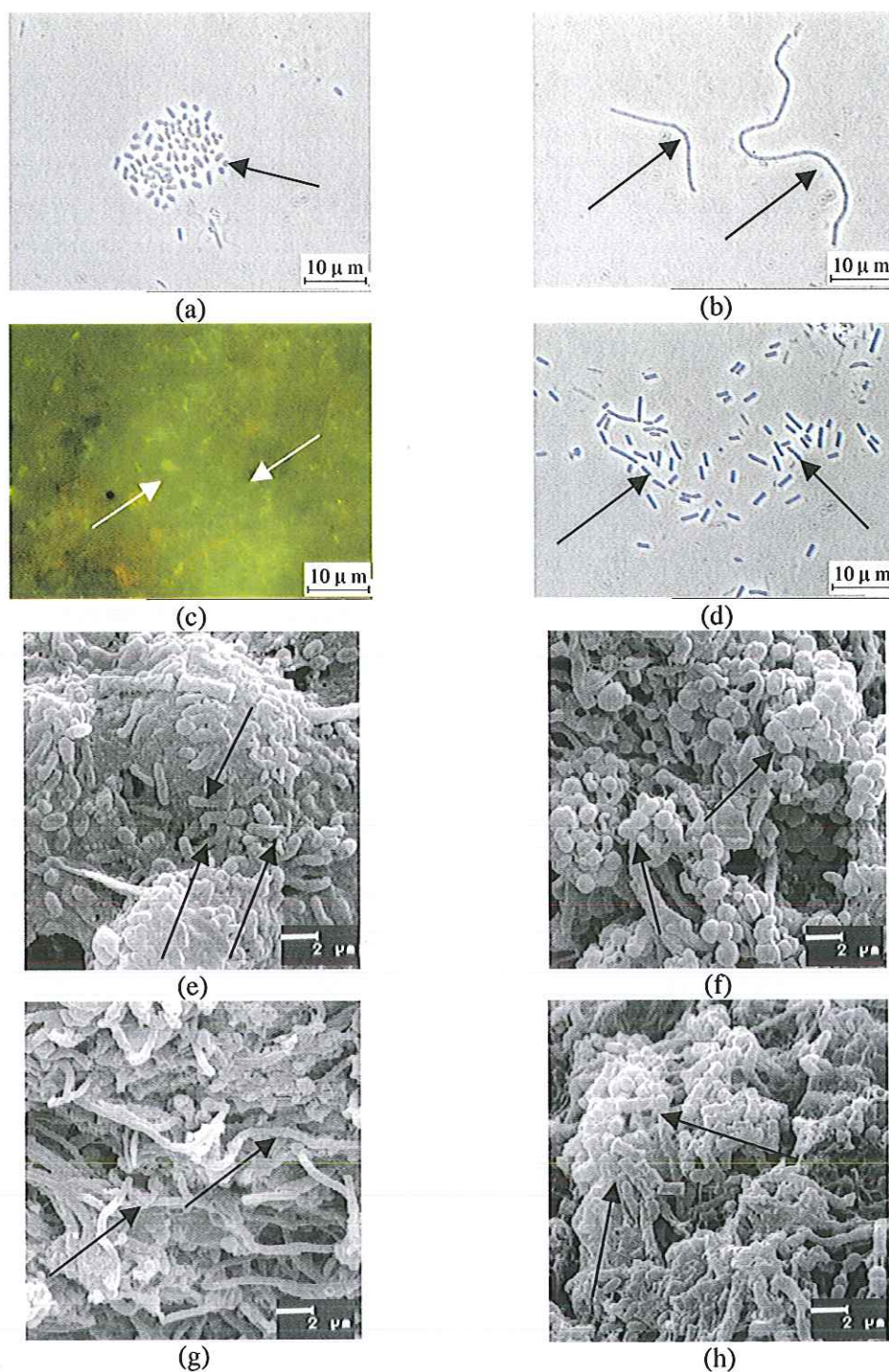


Figura 5.80: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 13^o dia do ciclo, utilizando extrato de carne como substrato: (a) coco-bacilos; (b) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (c) bacilos e cocos fluorescentes; (d) bacilos; (e) bacilos; (f) cocos; (g) filamentos; (h) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp.

5.8.5. - 16º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato

As análises de microscopia ótica indicaram a predominância de cocos (Figura 5.81 c). A presença de bacilos, filamentos e microorganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp (Figura 5.81 a, b) foi verificada. Cocos e bacilos fluorescentes também foram observados (Figura 5.81 d).

As análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram a predominância de microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.81 e) e cocos (Figura 5.81 f). Foi verificada também a presença de bacilos e vibrios aderidos às matrizes de espuma (Figura 5.81 g, h).

No ciclo utilizando extrato de carne, da mesma maneira que no alimentado com amido, verificou-se que os cocos apresentavam estruturas distribuídas em diferentes planos e de maneira randômica (BLACK, 1999). Esses arranjos de cocos foram diferentes dos encontrados no ciclo utilizando glicose como substrato.



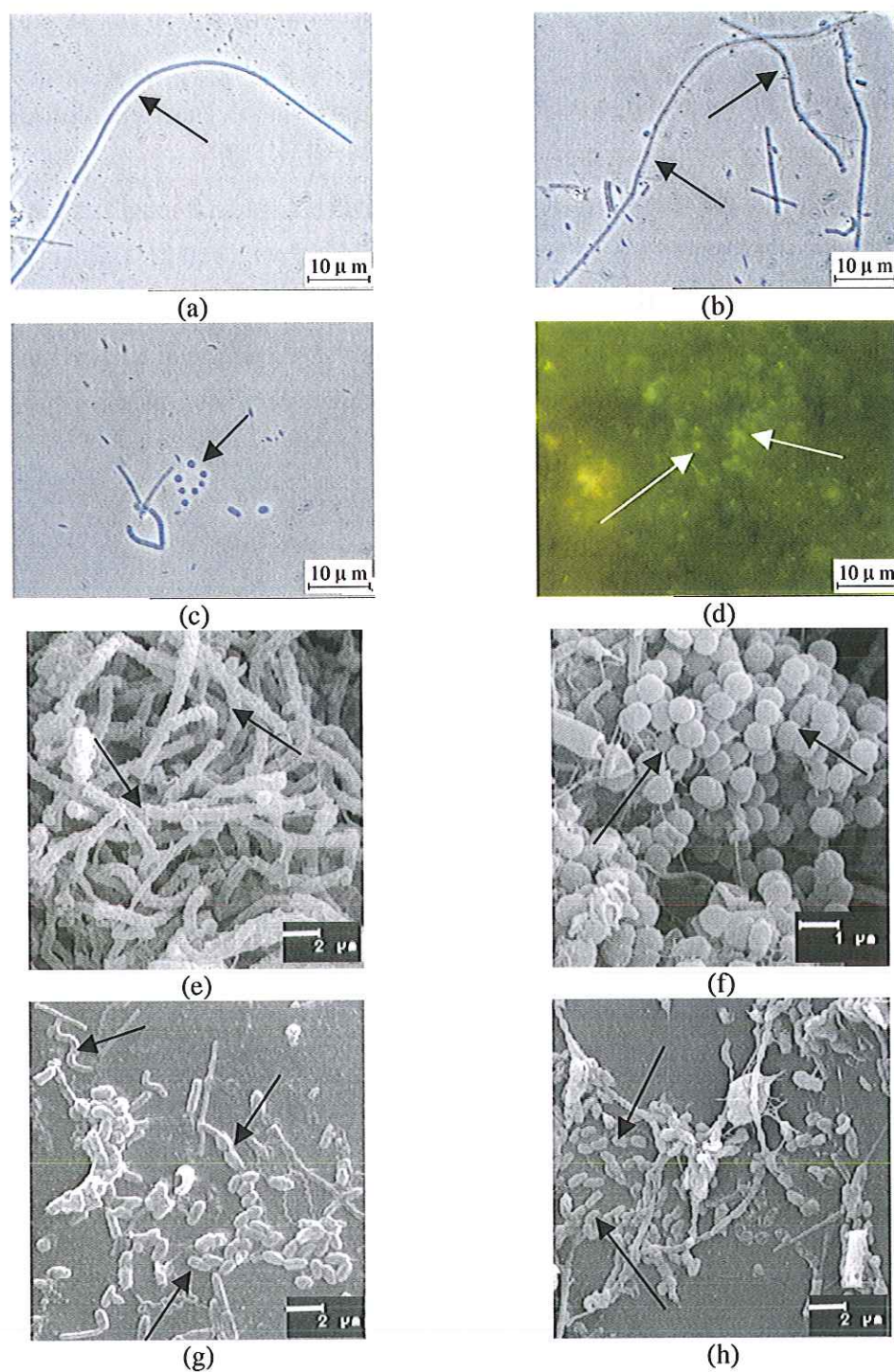


Figura 5.81: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 16º dia do ciclo, utilizando extrato de carne como substrato: (a) e (b) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp, (c) cocos; (d) cocos e bacilos fluorescentes; (e) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (f) cocos; (g) bacilos e vibrios; (h) bacilos.

5.8.6. - 21º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato

Segundo as imagens de microscopia ótica, as amostras referentes ao 21º de ciclo indicaram a predominância de cocos (Figura 5.82 b) e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.82 a). Verificou-se pequena ocorrência de bacilos nos campos observados (Figura 5.82 b, c). Os exames de microscopia de epifluorescência mostraram grande quantidade de bacilos e cocos metanogênicos (Figura 5.82 d).

As análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram a predominância de microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.82 f, h) e cocos (Figura 5.82 e, g).

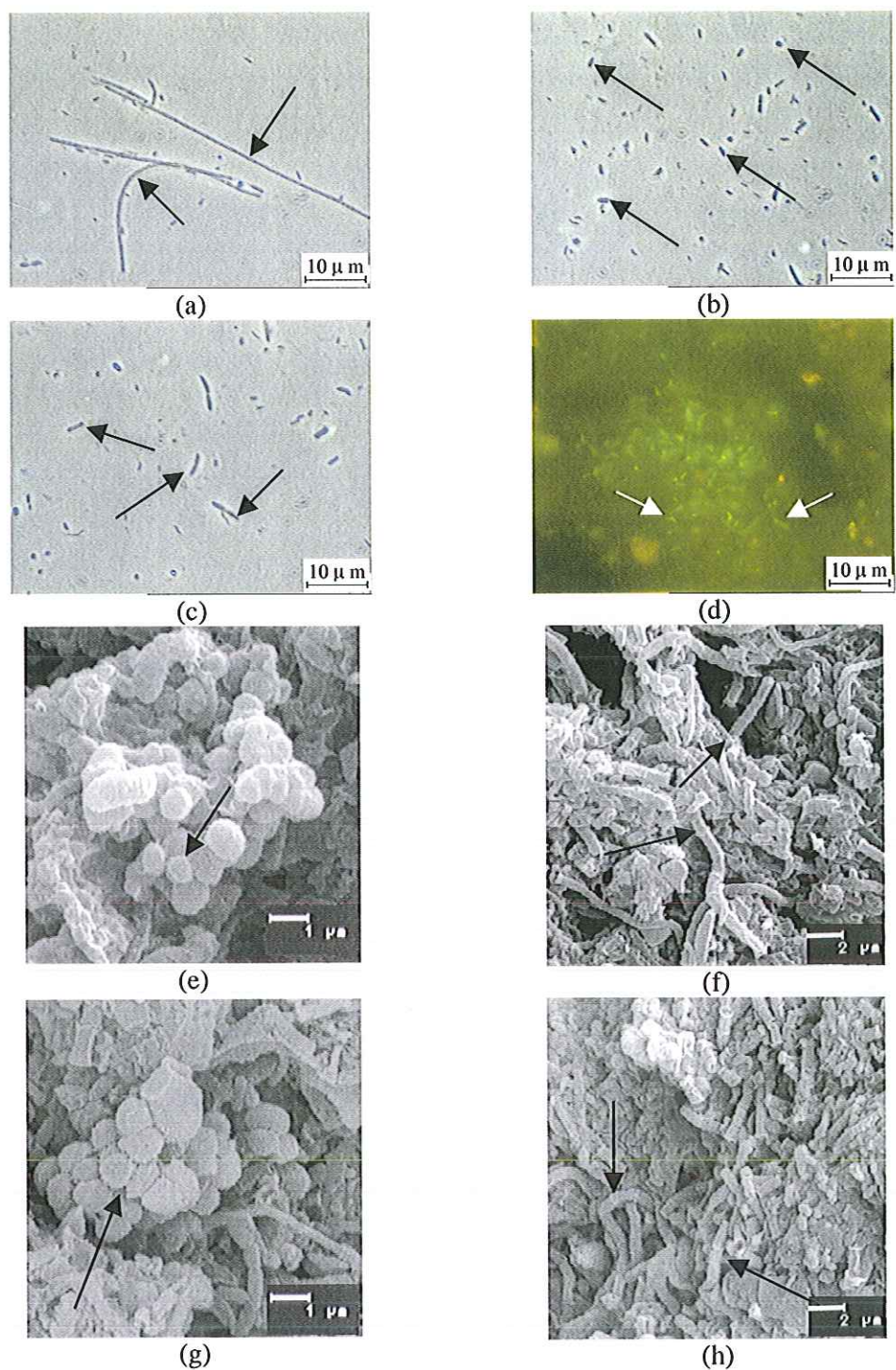


Figura 5.82: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura referentes às amostras do reator retirado no 21º dia do ciclo utilizando extrato de carne como substrato: (a), (f) e (h) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (b), (e) e (g) cocos; (c) bacilos; (d) cocos e bacilos fluorescentes.

5.8.7. - 24º dia de operação do ciclo utilizando extrato de carne como substrato

Ao final do ciclo utilizando extrato de carne como substrato verificou-se a predominância de cocos (Figura 5.83 a) e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.83 b).

Uma grande ocorrência de bacilos e cocos fluorescentes foi verificada nas amostras do 24º dia de ciclo (Figura 5.83 d). As análises de microscopia de epifluorescência também mostraram a presença de microorganismos de morfologia semelhante ao gênero *Methanosarcina* sp (Figura 5.83 c).

Da mesma forma que nos dias anteriores, as análises de microscopia eletrônica de varredura revelaram a predominância de cocos (Figura 5.83 e, f) e de microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.83 g). A maior ocorrência de filamentos também foi verificada (Figura 5.83 h).

Como nos ciclos alimentados com glicose e amido, o modelo sigmoidal ajustado, referente à colonização das matrizes de poliuretano (Figura 5.7 e Tabela 5.10), também indicou a estabilização da concentração de biomassa a partir do 24º dia.

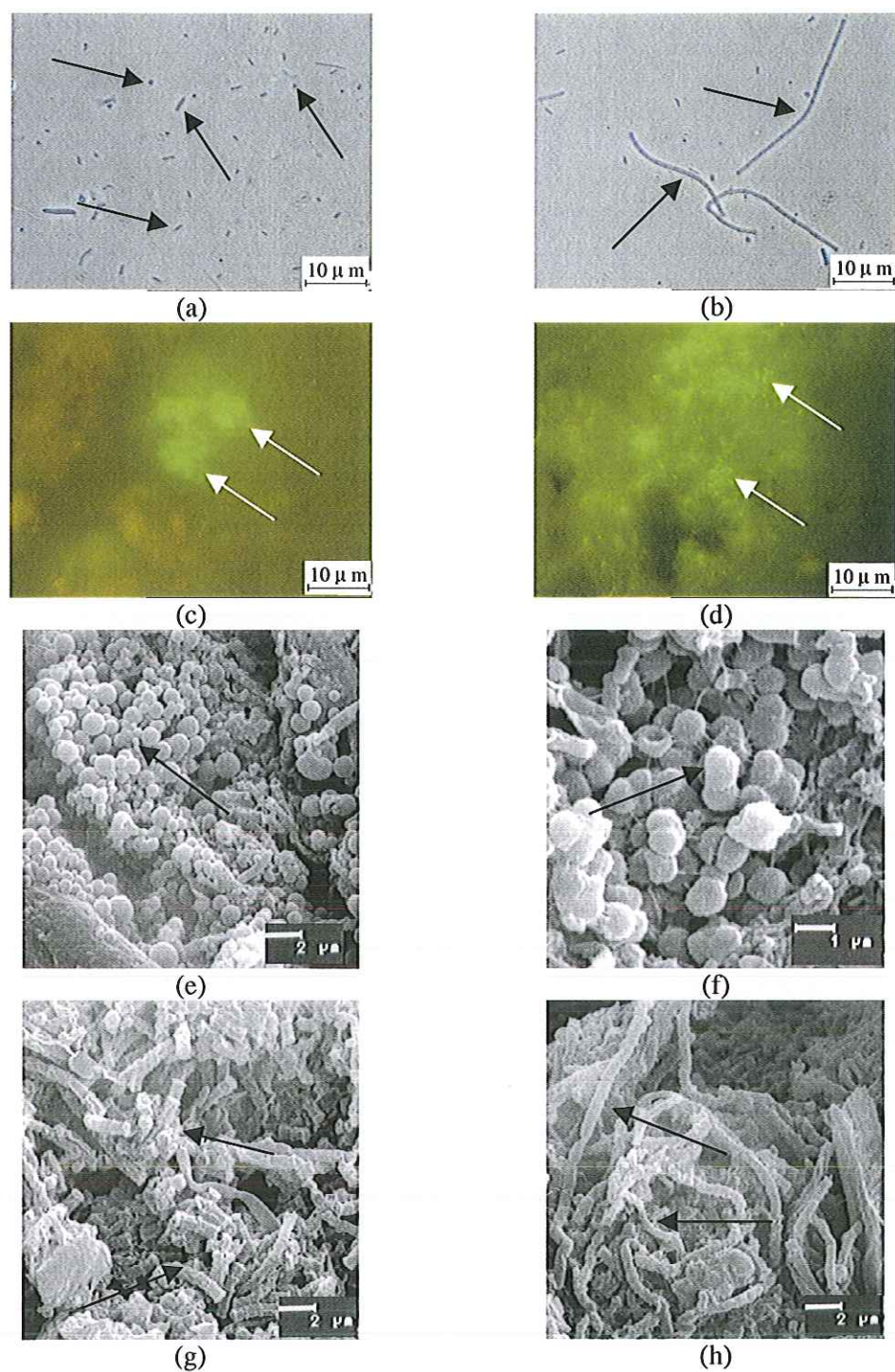


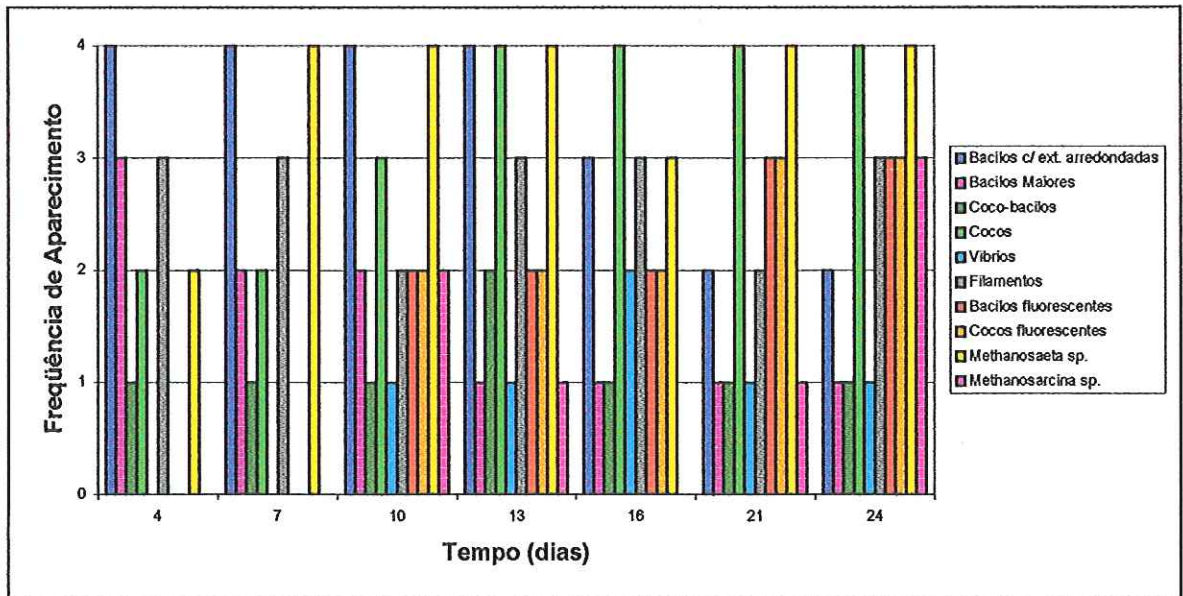
Figura 5.83: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura referentes às amostras do reator retirado no 24º dia do ciclo utilizando extrato de carne como substrato: (a) cocos e bacilos; (b) e (g) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (c) microorganismos semelhantes a *Methanosarcina* sp; (d) cocos e bacilos fluorescentes; (e) e (f) cocos; (h) filamentos.

De modo a facilitar a visualização da seqüência morfológica dos microorganismos presentes nos reatores alimentados com extrato de carne, construiu-se uma tabela e um gráfico contendo a relação das morfologias observadas nos dias amostrados (Tabela 5.38; Figura 5.84). Na quantificação dos microorganismos, procurou-se percorrer o maior número de campos possíveis, anotando as morfologias encontradas em cada campo.

Tabela 5.38: Morfologias dos microorganismos presentes nos reatores ao longo do ciclo alimentado com extrato de carne.

Morfologias	Extrato de Carne						
	Tempo (dias)						
	4°	7°	10°	13°	16°	21°	24°
Bacilos com extremidades arredondadas	++++	++++	++++	++++	+++	++	++
Filamentos	+++	+++	++	+++	+++	++	+++
Bacilos Fluorescentes	-	-	++	++	++	+++	+++
Cocos fluorescentes	-	-	++	++	++	+++	+++
<i>Methanosarcina</i> sp	-	-	++	+	-	+	+++
<i>Methanosaeta</i> sp.	++	++++	++++	++++	+++	++++	++++
Vibrios	-	-	+	+	++	+	+
Cocos	++	++	+++	++++	++++	++++	++++
Bacilos maiores	+++	++	++	+	+	+	+
Coco-Bacilos	+	+	+	++	+	+	+

(++++) Predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (-) não foram encontrados.



Frequência de Aparcimento: (4) Predominantes; (3) frequentes; (2) pouco frequentes; (1) raros; (0) não foram encontrados.

Figura 5.84: Frequência de aparecimento das morfologias, ao longo do tempo, para o ciclo utilizando extrato de carne como substrato.

5.9 Dinâmica de colonização do biofilme anaeróbio em matrizes de poliuretano em reatores utilizando esgoto sintético como substrato

5.9.1. - 4º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato

O esgoto sanitário é degradado em uma primeira etapa através da hidrólise de seus constituintes, produzindo açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, glicerol, galactose e outros produtos. Em seguida, esses compostos são fermentados, propiciando a liberação de acetato, etanol, propionato, hidrogênio, dióxido de carbono e outros compostos. Os ácidos graxos, formados nas etapas anteriores, são oxidados a acetato, hidrogênio e dióxido de carbono os quais são utilizados como substrato pelas arqueas metanogênicas na última etapa da digestão anaeróbia (KASPAR & WHURMANN, 1978)

Nas amostras referentes ao 4º dia de operação, as análises de microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura indicaram a predominância de bacilos com extremidades arredondadas (Figura 5.85 a, d), vibrios (Figura 5.85 a, d) e cocos (Figura 5.85 b, c, e, f). Esses microorganismos possivelmente podem estar ligados com as etapas de hidrólise e de fermentação anaeróbia. Constatou-se também a presença de bacilos de dimensões maiores (Figura 5.85 c, d) e de filamentos. Nessa fase não foram observadas arqueas metanogênicas.

Mais uma vez, observou-se que os bacilos foram os microorganismos responsáveis pela formação inicial do biofilme (Figura 5.85 g, h), sendo encontrados, em grande quantidade, aderidos à espuma. Constatou-se também uma grande quantidade de polímeros extracelulares.

A excreção de polímeros, quantificada na forma de polissacarídeos (Figura 5.23), teve comportamento semelhante ao dos ciclos utilizando óleo de soja e extrato de carne como substrato. Estes resultados também indicaram maior produção específica de polímeros nos primeiros dias de operação do ciclo, o que pode estar relacionado provavelmente com o fenômeno de aderência inicial. No entanto, os valores de massa polímeros, quantificados na forma de polipeptídios por grama de biomassa, permaneceram praticamente constantes ao longo do ciclo alimentado com esgoto sintético (Figura 5.24).

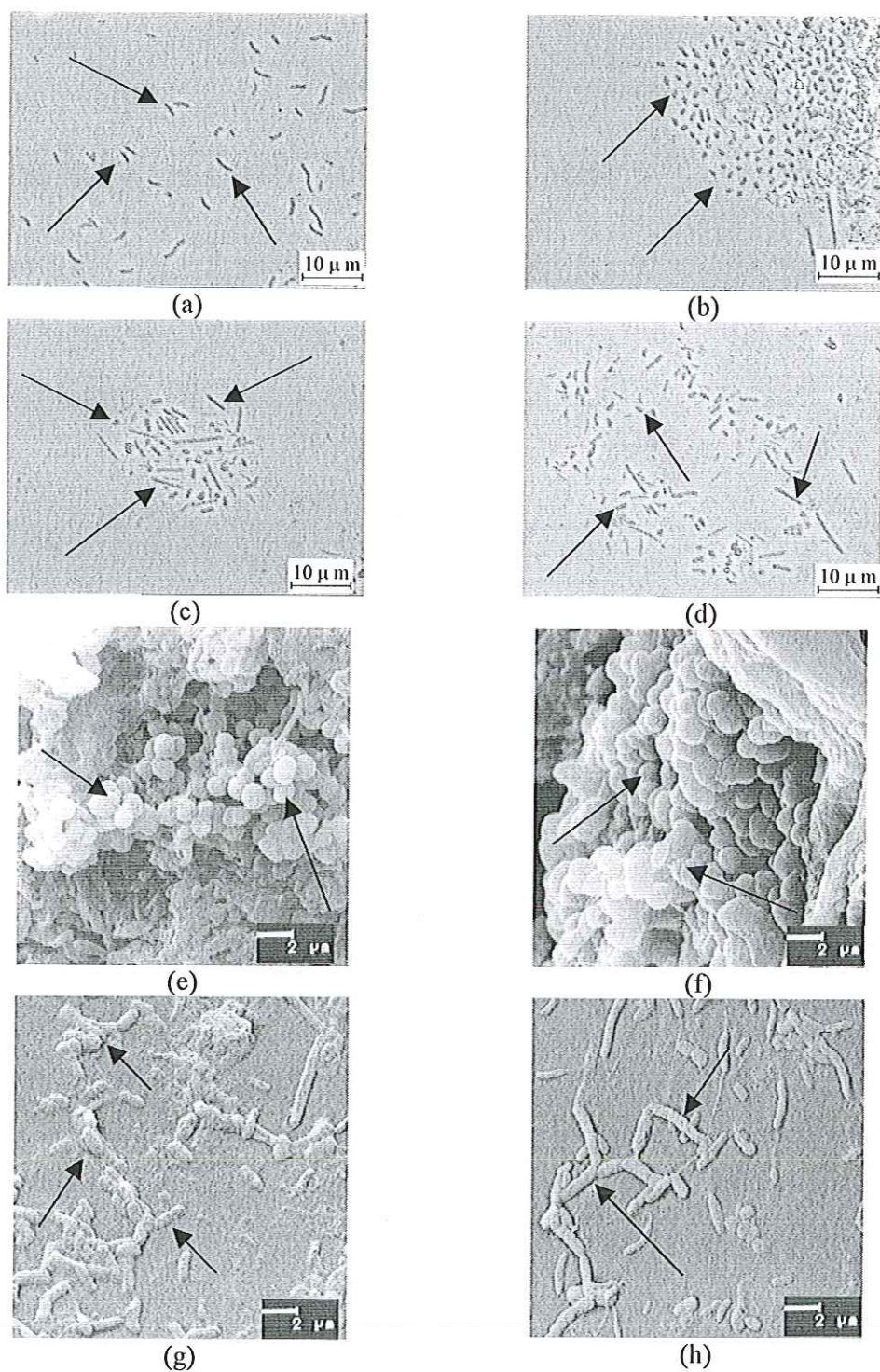


Figura 5.85: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 4º dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato: (a) bacilos e vibrios; (b) cocos; (c) bacilos e cocos; (d) bacilos, cocos e vibrios; (e) e (f) cocos; (g) e (h) bacilos.

5.9.2. - 7º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato

As análises de microscopia de contraste de fase revelaram a predominância de cocos nas amostras referentes ao 7º dia de operação (Figura 5.86 b). A grande ocorrência de bacilos (Figura 5.86 c), filamentos (Figura 5.86 d) e protozoários também foi verificada. As análises de microscopia de epifluorescência realizadas mostraram a presença de microorganismos de morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp (Figura 5.86 a).

As imagens de microscopia eletrônica de varredura apresentaram a predominância de bacilos com extremidades arredondadas (Figura 5.86 g) e cocos (Figura 5.86 e). Como nos ciclos anteriores, verificou-se que a colonização inicial se deu através da aderência de bacilos (Figura 5.86 g). A presença de filamentos (Figura 5.86 f) e protozoários (Figura 5.86 h) também foi verificada.

A presença de protozoários deve estar relacionada diretamente com as características do esgoto sintético, já que nos ensaios anteriores esses microorganismos não foram observados. Deve-se ressaltar que esses organismos não são indicadores da presença de condições aeróbias no sistema. FENCHEL & FINLAY (1991) constataram a existência de protozoários anaeróbios estritos. Os autores verificaram que estes organismos obtêm a energia necessária para o metabolismo através da fermentação e da fosforilação em nível de substrato.

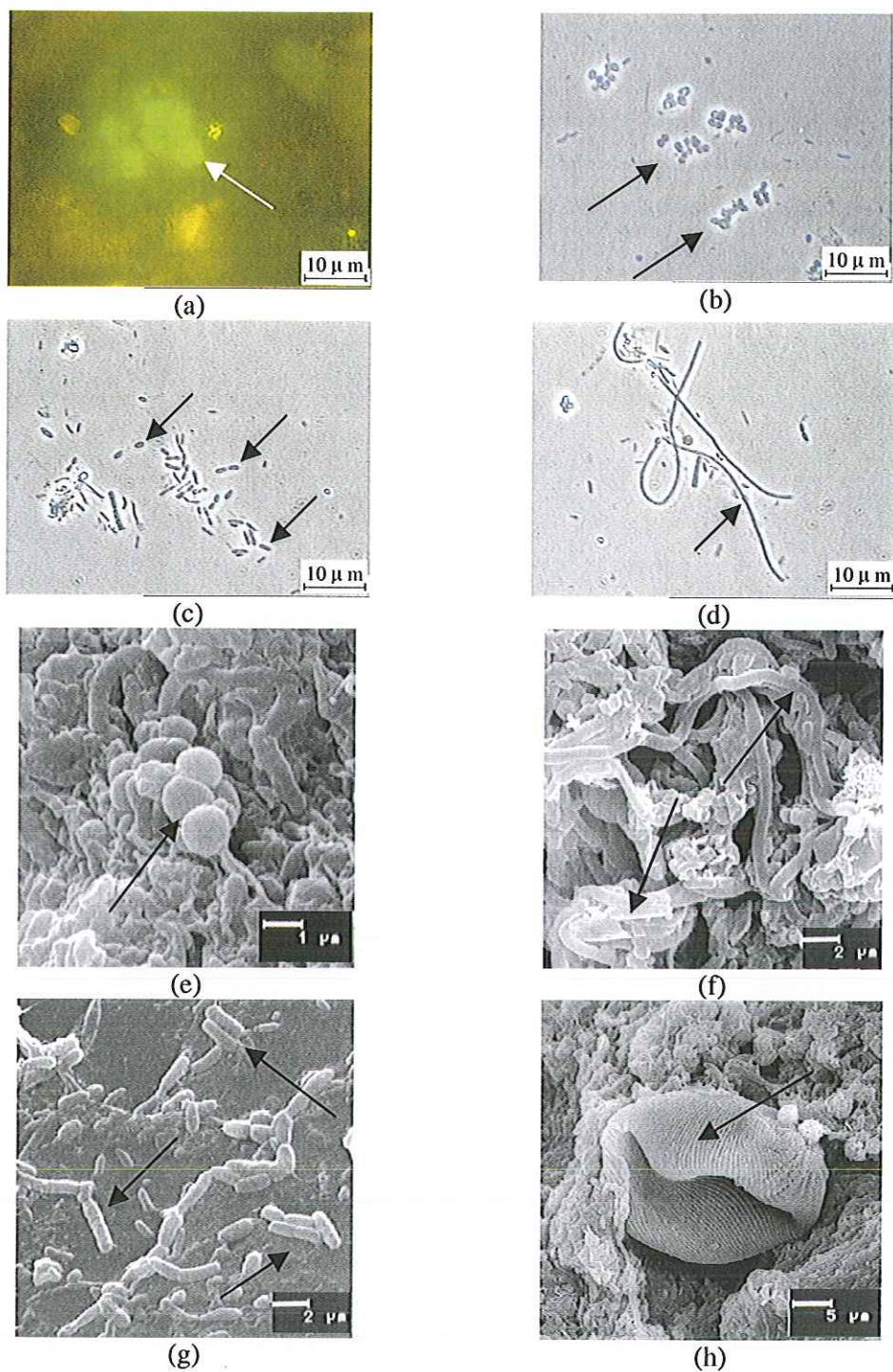


Figura 5.86: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 7º dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato: (a) microorganismos semelhantes a *Methanosarcina* sp; (b) cocos; (c) bacilos; (d) filamentos; (e) cocos; (f) filamentos; (g) bacilos; (h) protozoário.

5.9.3. - 10º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato

Nas amostras referentes ao 10º dia de operação pode-se constatar a grande ocorrência de cocos nos campos visualizados (Figura 5.87 c). As análises de microscopia de contraste de fase mostraram a predominância de bacilos com extremidades arredondadas (Figura 5.87 a). Verificou-se também a presença de filamentos, microorganismos de semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.87 d) e microorganismos de morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp (Figura 5.87 b).

Através das análises de microscopia eletrônica de varredura, constatou-se a predominância de bacilos longos (Figura 5.87 e, f) e cocos (Figura 5.87 h) e filamentos (Figura 5.87 g).

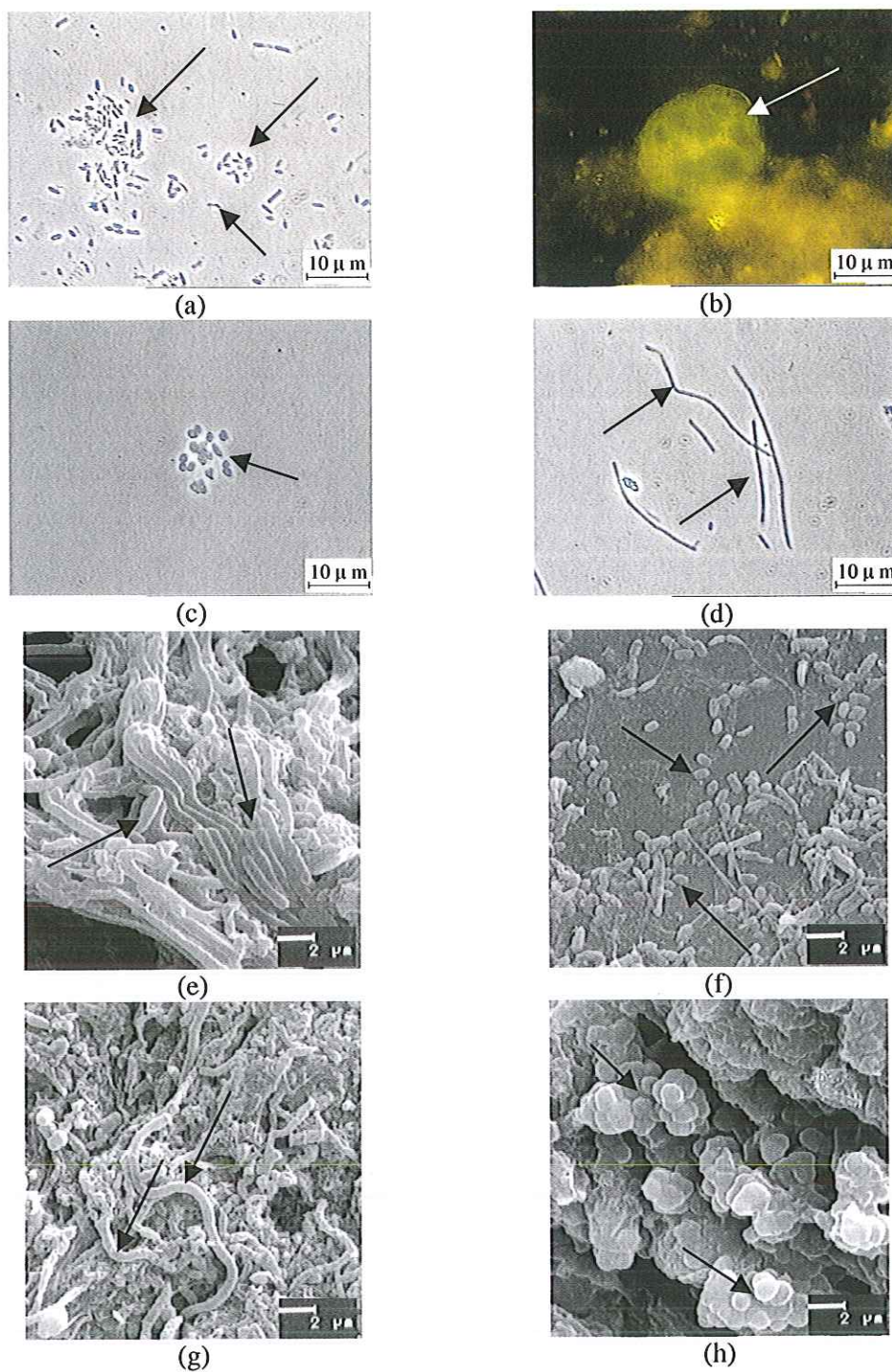


Figura 5.87: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 10^o dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato: (a) bacilos com extremidades arredondadas; (b) microorganismos semelhantes a *Methanosarcina* sp; (c) cocos; (d) microorganismos de semelhantes a *Methanosaeta* sp; (e) e (f) bacilos; (g) filamentos, (h) cocos.

5.9.4. - 13º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato

As análises de microscopia de contraste de fase mostraram a predominância de cocos (Figura 5.88 a), bacilos (Figura 5.88 d). Verificou-se também a presença de filamentos (Figura 5.88 b), vibrios (Figura 5.88 a) e microorganismos de semelhantes à *Methanosaeta* sp. As análises de microscopia de epifluorescência mostraram a grande ocorrência de bacilos e cocos fluorescentes, provavelmente pertencentes aos gêneros *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* e *Methanococcus*, respectivamente (Figura 5.88 c). Também foi constatada a presença microorganismos semelhantes a *Methanosarcina* sp.

Segundo as imagens de microscopia eletrônica de varredura, verificou-se a predominância de cocos (Figura 5.88 e, g) e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.88 f, h). A presença de bacilos também foi verificada.

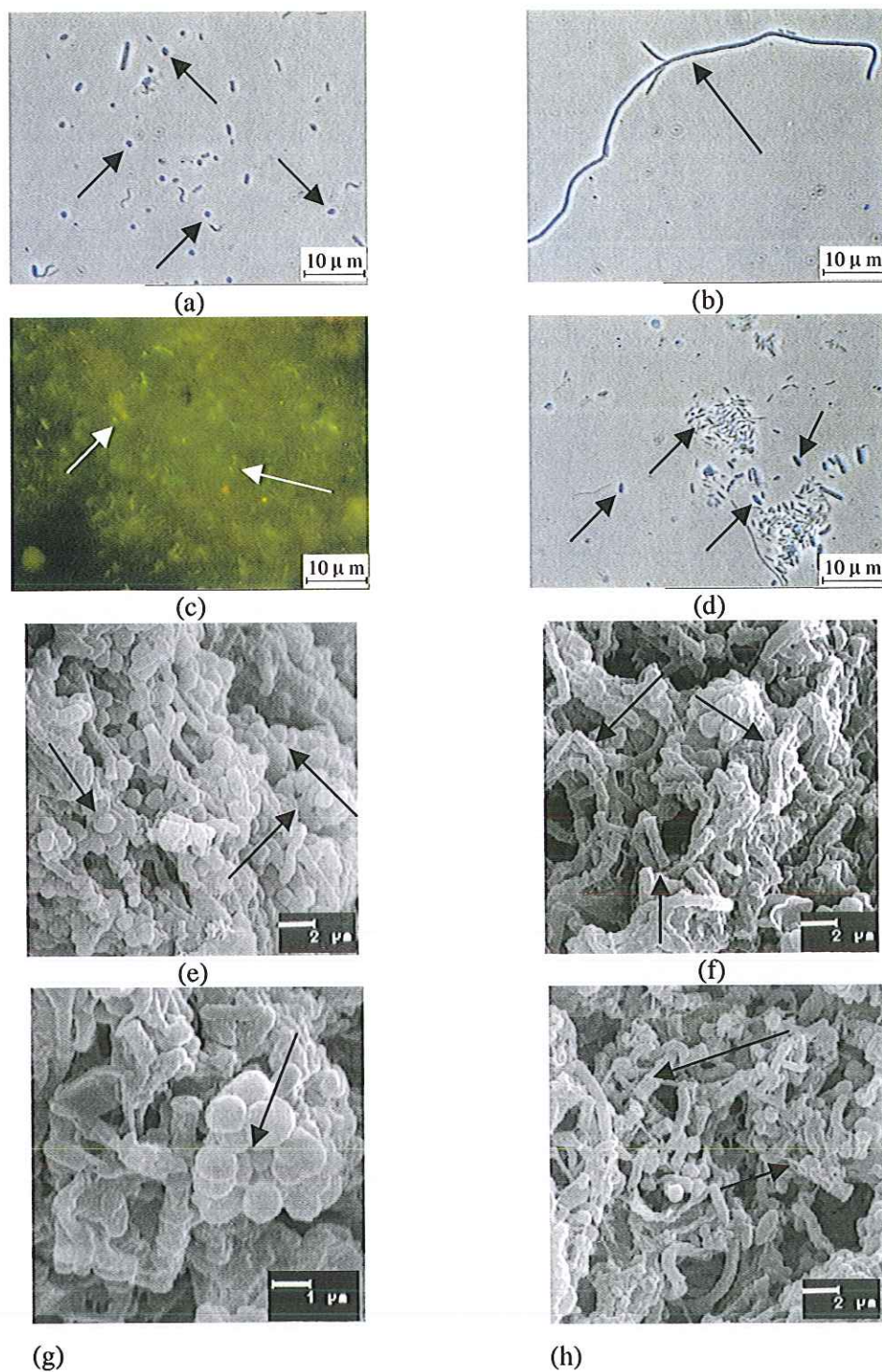


Figura 5.88: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 13^o dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato: (a) cocos; (b) filamentos; (c) bacilos e cocos fluorescentes; (d) bacilos; (e) e (g) cocos; (f) e (h) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp.

5.9.5. - 16º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato

Nas amostras coletadas no 16º dia de operação, constatou-se a predominância de cocos nas amostras analisadas sob microscopia ótica (Figura 5.89 c, d). Bacilos (Figura 5.89 b), vibrios (Figura 5.89 b), filamentos (Figura 5.89 a) e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp também foram identificados.

As análises de microscopia eletrônica de varredura revelaram a predominância de microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.89 f) e cocos (Figura 5.89 g). Verificou-se também a presença de filamentos (Figura 5.89 h), protozoários (Figura 5.89 e) e bacilos no biofilme formado.

A velocidade máxima de colonização foi atingida no 17º dia de operação. De acordo com a Figura 5.10 e de acordo com a Tabela 5.12, verificou-se que os valores para a velocidade máxima de colonização foram maiores para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. Este resultado se deve, provavelmente, ao fato de se estar fornecendo uma fonte complexa de substrato, favorecendo o crescimento dos microorganismos presentes no consórcio microbiano.

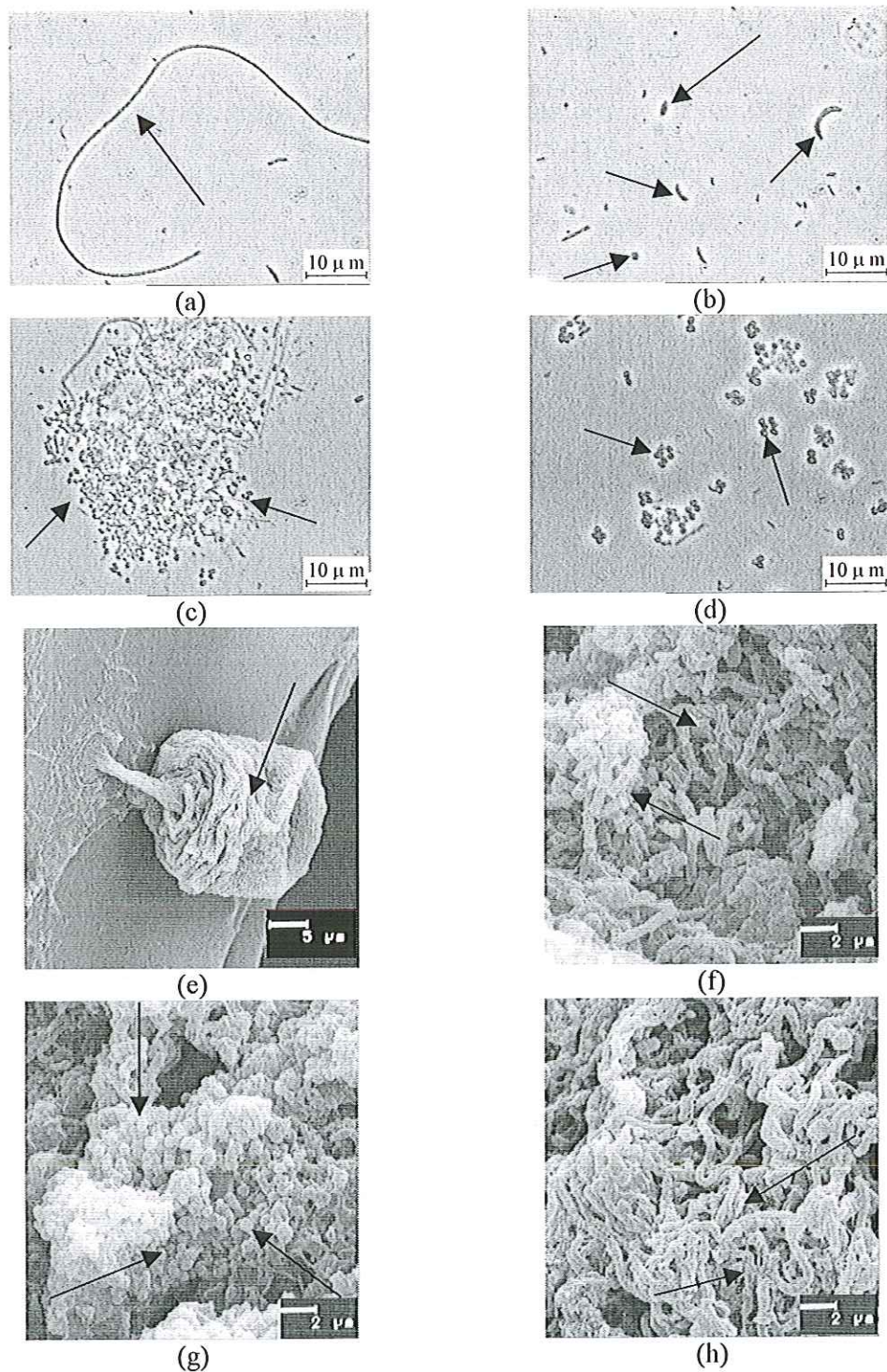


Figura 5.89: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 16º dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato: (a) filamentos; (b) vibrios e bacilos; (c) e (d) cocos; (e) protozoário; (f) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (g) cocos; (h) filamentos

5.9.6. - 21º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato

As amostras retiradas no 21º dia de ciclo revelaram a predominância de cocos (Figura 5.90 c), bacilos (Figura 5.90 d) e microorganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp (Figura 5.90 b). Bacilos e cocos fluorescentes também foram identificados (Figura 5.90 a).

As análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram a predominância de microorganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp (Figura 5.90 h) e cocos (Figura 5.90 f). Também se verificou a grande ocorrência de bacilos presentes nos agregados celulares (Figura 5.90 e, g).

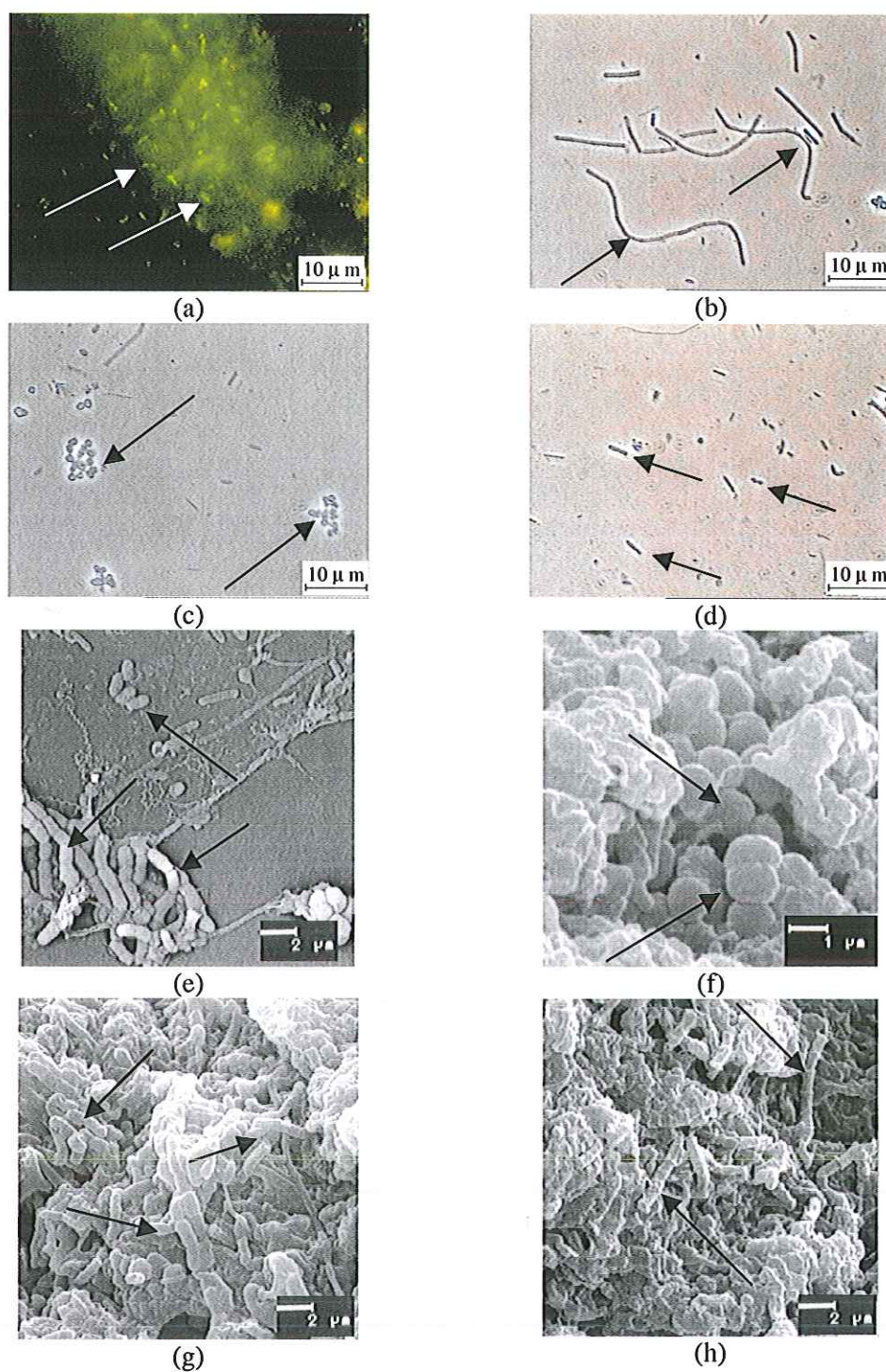


Figura 5.90: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 21º dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato: (a) bacilos e cocos fluorescentes; (b) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (c) cocos; (d) bacilos; (e) e (g) bacilos isolados e em cadeia; (f) cocos; (h) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp.

5.9.7. - 24º dia de operação do ciclo utilizando esgoto sintético como substrato

Segundo as análises de microscopia de contraste de fase, constatou-se a predominância de cocos (Figura 5.91 c, d) e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.91 b). Filamentos (Figura 5.91 d), vibrios (Figura 5.91 a) e bacilos (Figura 5.91 a) também foram observados. Verificou-se também a grande ocorrência de bacilos e cocos fluorescentes.

Através das análises de microscopia eletrônica de varredura pode-se constatar a grande variedade morfológica presente nas amostras do 24º dia. Verificou-se a grande ocorrência de cocos (Figura 5.91 f, g), filamentos (Figura 5.91 e), bacilos (Figura 5.91 h) e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.91 f).

Constatou-se, através da tabela 5.6 e da Figura 5.9, que os valores para a quantidade de biomassa aderida às espumas foram maiores para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato. Este resultado pode ser devido à utilização de uma fonte complexa de substrato na alimentação dos reatores.

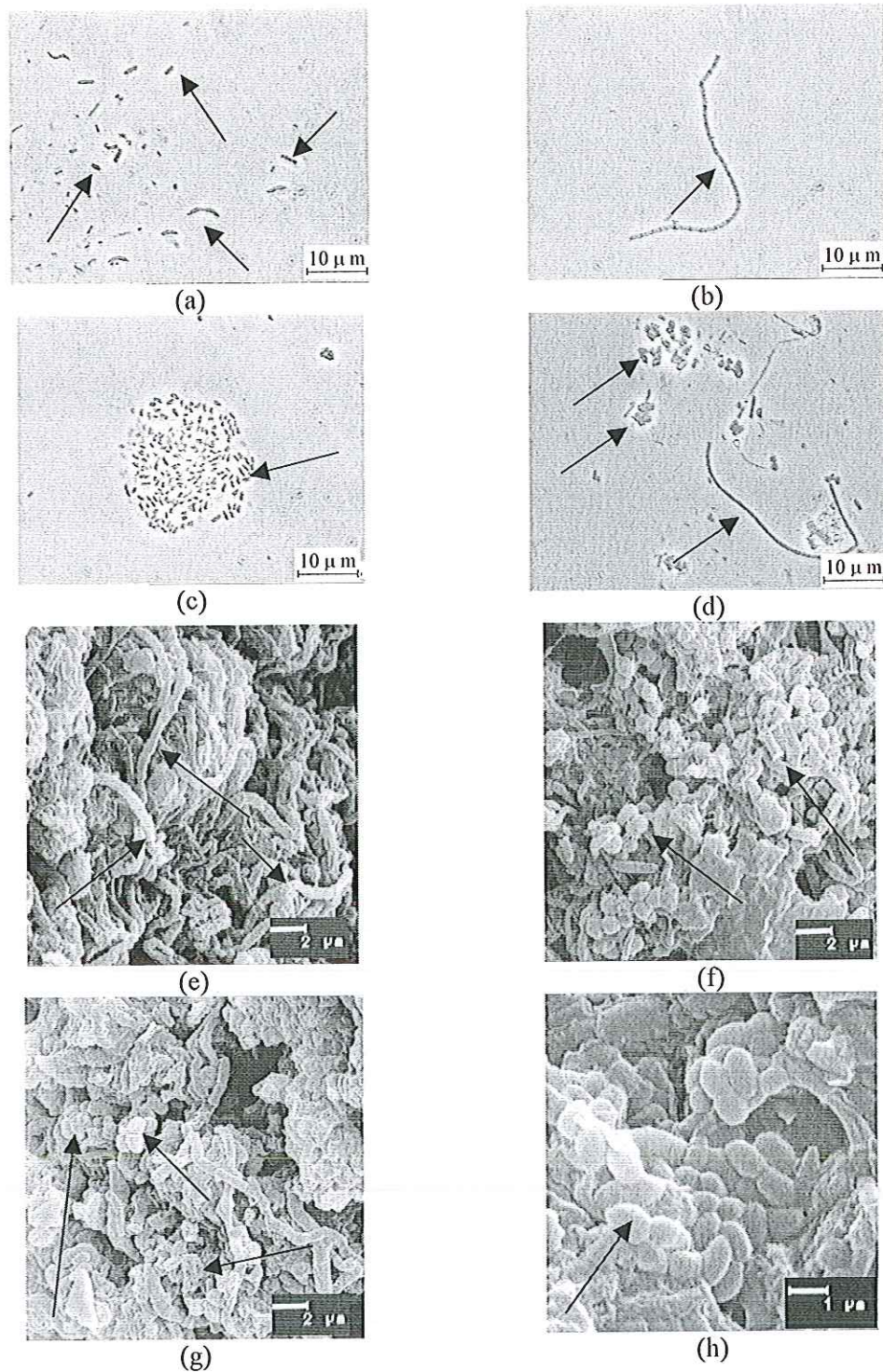


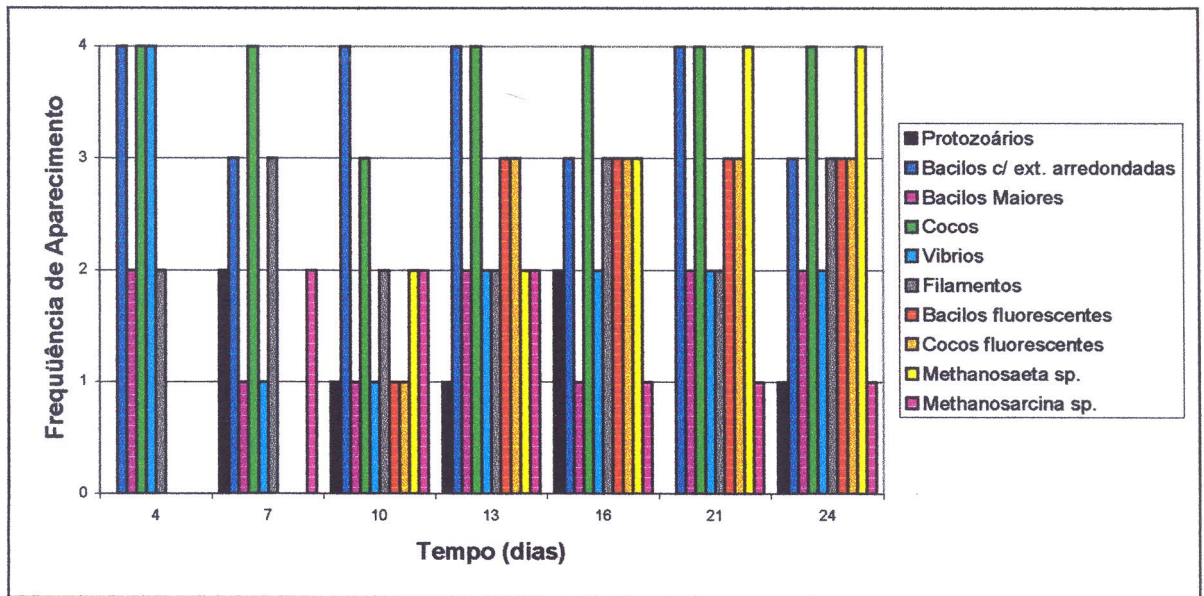
Figura 5.91: Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase, de epifluorescência e eletrônica de varredura, referentes às amostras do reator retirado no 24º dia do ciclo, utilizando esgoto sintético como substrato: (a) vibrios e bacilos; (b) microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (c) cocos; (d) cocos e filamentos; (e) filamentos; (f) cocos e microorganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (g) cocos; (h) bacilos.

De modo a facilitar a visualização da seqüência morfológica dos microorganismos presentes nos reatores alimentados com esgoto sintético, construiu-se uma tabela e um gráfico contendo a relação das morfologias observadas nos dias amostrados (Tabela 5.39; Figura 5.92). Na quantificação dos microorganismos, procurou-se percorrer o maior número de campos possíveis, anotando as morfologias encontradas em cada campo.

Tabela 5.39: Morfologias dos microorganismos presentes nos reatores ao longo do ciclo alimentado com esgoto sintético.

		Esgoto sintético						
		Tempo (dias)						
Morfologias		4°	7°	10°	13°	16°	21°	24°
Bacilos com extremidades arredondadas		++++	+++	++++	++++	+++	++++	+++
Filamentos		++	+++	++	++	+++	++	+++
Bacilos Fluorescentes		-	-	+	+++	+++	+++	+++
Cocos fluorescentes		-	-	+	+++	+++	+++	+++
<i>Methanosarcina</i> sp		-	++	++	++	+	+	+
<i>Methanosaeta</i> sp.		-	-	++	++	+++	++++	++++
Vibrios		++++	+	+	++	++	++	++
Cocos		++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++
Bacilos maiores		++	+	+	++	+	++	++
Protozoários		-	++	+	+	++	-	+

(++++) Predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (-) não foram encontrados.



Frequência de Aparecimento: (4) Predominantes; (3) frequentes; (2) pouco frequentes; (1) raros; (0) não foram encontrados.

Figura 5.92: Frequência de aparecimento das morfologias, ao longo do tempo, para o ciclo utilizando esgoto sintético como substrato.

5.10 Identificação de Polímeros Extracelulares

Os polímeros extracelulares foram identificados, na forma de polímeros carboxilados e sulfatados, segundo o item 4.6.5 (PASSOW & ALLDREDGE, 1995).

As análises sob microscopia ótica de luz comum indicaram a presença de polímeros ácidos (Figura 5.93 a; c; e; g; i) e sulfatados (Figura 5.93 b; d; f; h; j) em todas as amostras analisadas. Nessas análises foram verificadas regiões onde conjuntos de células apresentavam coloração azul, evidenciando a presença de polímeros extracelulares. Esses resultados reforçam os anteriormente obtidos nas análises de quantificação de polímeros na forma de polissacarídeos e polipeptídios, além das observações sob microscopia eletrônica de varredura.

É importante ressaltar que esta metodologia é válida apenas para a detecção de polímeros ácidos e sulfatados. Polímeros neutros podem também estar presentes .

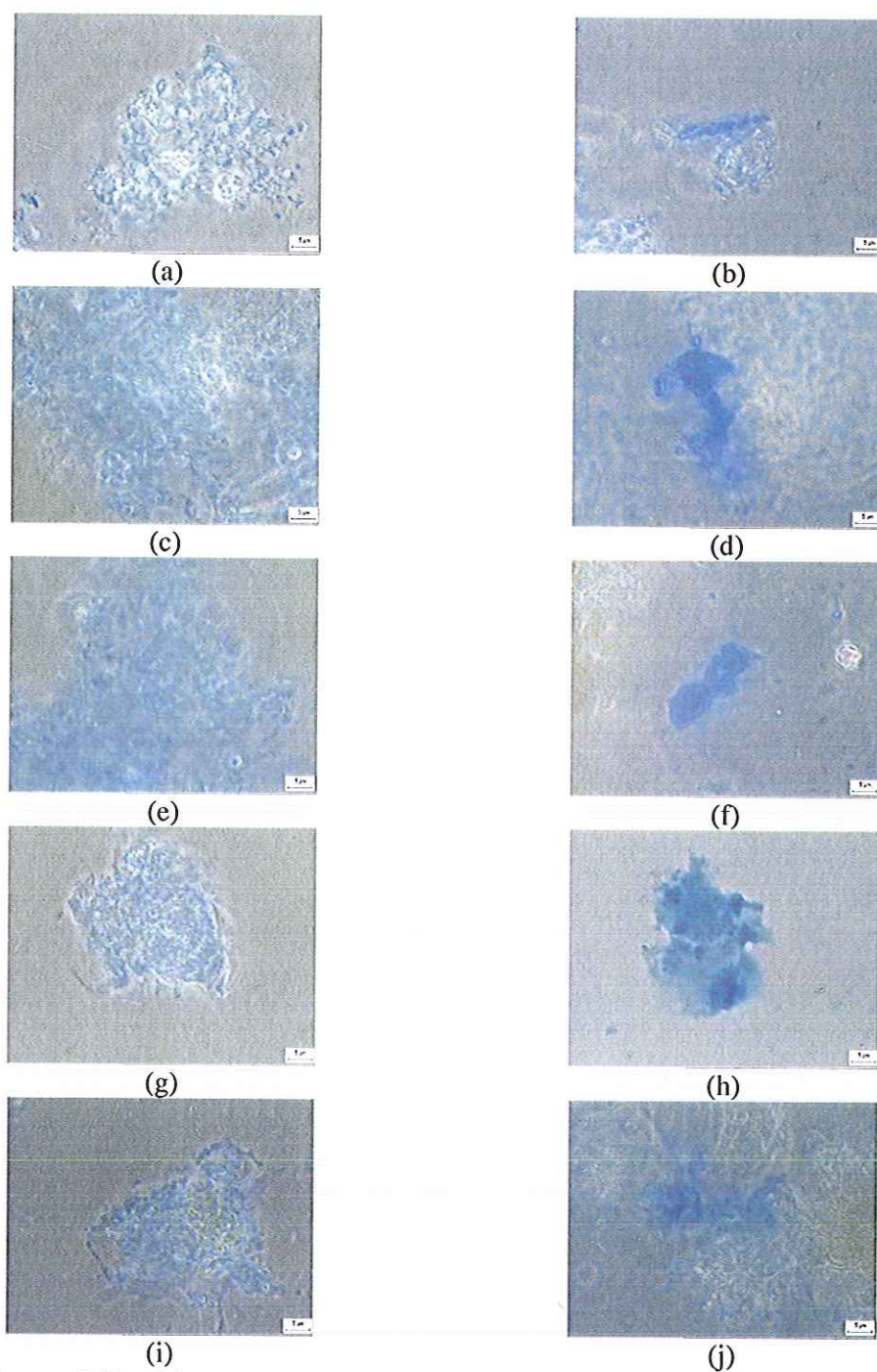


Figura 5.93: Observações sob microscopia de contraste de fase dos polímeros extracelulares: glicose - (a) ácidos, (b) sulfatados; amido - (c) ácidos, (d) sulfatados; óleo de soja - (e) ácidos, (f) sulfatados; extrato de carne - (g) ácidos (h) sulfatados; esgoto sintético - (i) ácidos (j) sulfatados.

5.11 Discussão geral dos resultados – Influência do substrato na aderência de microorganismos

Os dados de monitoramento indicaram a estabilidade dos sistemas estudados e o aumento da atividade microbiana ao longo do tempo. Todavia, o ciclo alimentado com extrato de carne apresentou uma maior sensibilidade à retirada de reatores ao longo da operação, provavelmente ocasionada pela diminuição da biomassa disponível para a degradação da matéria orgânica. Verificou-se também uma maior concentração final de matéria orgânica no término do ciclo alimentado com óleo de soja, o que pode ser atribuído à baixa biodisponibilidade do óleo de soja devido a sua reduzida solubilidade na água.

Em relação à colonização das matrizes de poliuretano, foram observados comportamentos muito semelhantes para os ciclos utilizando glicose, amido, extrato de carne e esgoto sintético como substrato. No início dos ciclos, a quantidade de biomassa retida na espuma permaneceu praticamente constante. Depois de aproximadamente duas semanas, houve um sensível aumento, e a partir do 21º dia de operação, verificou-se uma estabilização da biomassa acumulada nas matrizes.

Já o ciclo alimentado com óleo de soja apresentou um comportamento diferenciado no processo de colonização, onde um aumento gradual da biomassa aderida à espuma foi observado. Este comportamento se deu, provavelmente, devido à adsorção de moléculas de óleo, as quais formaram um filme condicionante, alterando as características do material de suporte e por conseguinte o processo de aderência dos microorganismos.

Quando foi utilizada uma fonte complexa de carbono, o esgoto sintético, verificou-se uma maior quantidade de biomassa aderida às matrizes de poliuretano (2,07 SVT/Espuma no 24º dia) que nos demais ciclos (de 1,52 a 1,69 SVT/Espuma). A diversidade de substratos parece ter contribuído para a aderência de uma maior quantidade de biomassa. No entanto, verificou-se que as velocidades médias de colonização não sofreram uma grande influência da composição do substrato. Foi observado um valor médio de velocidade de colonização de $0,056 \pm 0,004$ g SVT/g Espuma.dia para todos os casos estudados.

A rápida aderência em todos os ciclos estudados justifica as rápidas partidas observadas em trabalhos utilizando espuma de poliuretano como suporte (ZAIAT et al, 1997, ZAIAT et al., 2000; SARTI et al., 2001). Tempos de partida por volta de 8 a 15 dias têm sido relatados para sistemas com espuma pré-inoculada, enquanto que tempo de partida de 8 semanas foi observado em reator horizontal tratando esgoto sanitário real com concentração de sólidos em suspensão afluente de aproximadamente 70 mg/L.

O fenômeno de excreção de polímeros parece sofrer uma grande influência do substrato utilizado na etapa de aderência inicial (até o 10º dia). Entretanto, após essa fase inicial, a excreção dos polímeros se dá de maneira independente do substrato utilizado na alimentação dos reatores, pois a produção específica de polímeros se estabiliza em uma faixa muito estreita de concentração para todos os ciclos estudados.

Os ciclos alimentados com glicose e amido apresentaram, até por volta do 10º dia, um crescente aumento na excreção de polímeros em relação à proporção de biomassa aderida. Esse comportamento ocorre, possivelmente, devido à aderência à superfície da espuma. Depois dessa fase há uma diminuição sensível da excreção de polissacarídeos tendendo ao final do ciclo para uma estabilização da produção de polímeros em relação ao crescimento celular.

Os ciclos alimentados com óleo de soja e extrato de carne apresentaram a velocidade máxima de produção de polímeros ocorrendo no início do ciclo, permitindo a aderência dos microorganismos às matrizes de poliuretano.

Os modelos ajustados para a quantificação de polímeros extracelulares por grama de espuma indicaram uma tendência de crescimento. Este resultado pode estar vinculado ao entupimento de reatores anaeróbios de leito fixo relatado freqüentemente na literatura (ZAIAT et al., 2000), já que tais entupimentos não podem ser explicados pelos modelos para a colonização das espumas pela biomassa anaeróbia, pois estes últimos indicam uma estabilização na biomassa aderida a partir de um certo período.

Como já foi citado anteriormente, os polímeros excretados podem permanecer no interior dos suportes e nos interstícios do leito, causando problemas operacionais nos reatores de leito fixo. Estes problemas estão principalmente relacionados com a hidrodinâmica do sistema, a qual fica comprometida com ocorrência de caminhos preferenciais, zonas mortas e recirculação interna do líquido. A porosidade do leito é afetada, sofrendo diminuição efetiva ao longo do tempo, diminuindo, assim, os tempos de residência aplicados e aumentando a perda de carga no reator. Esses problemas progressivos podem culminar em impossibilidade de operação devido à perda de carga elevada e, até mesmo, entupimento do leito.

CABRAL (2000) operando um RAHLF, alimentado com uma concentração de DQO de aproximadamente de 1000 mg/L (45% amido; 35% sacarose, 25% glicose), verificou o entupimento parcial do leito do reator provocado pela proliferação de “um material brando leitoso”, nas duas primeiras seções do reator. Este fato pode estar relacionado com a produção de polímeros extracelulares, pois de acordo com o modelo ajustado (Figura 5.32 e Tabela 5.27), a produção de polímeros, na forma de polipeptídios, apresenta um crescimento

exponencial para reatores de leito fixo, alimentados com amido, utilizando espuma de poliuretano como suporte.

O processo de aderência apresentou comportamento semelhante para todos os substratos utilizados. Na fase inicial de aderência, os bacilos aderiram preferencialmente à espuma de poliuretano, enquanto que os outros organismos aderiram sobre os polímeros excretados ou sobre a superfície dos organismos já aderidos. De forma geral, a dinâmica de aderência seguiu modelo proposto por van LOOSDRECHT (1990).

Foi observada, durante os ciclos, uma grande variabilidade morfológica. No entanto, predominância de organismos semelhantes a *Methanosaeta* foi verificada ao final dos ciclos, principalmente em relação a *Methanosarcina*. De acordo com VERRIER et al. (1987), a espécie *Methanosarcina mazei* não é adequada para formação de biofilmes em reatores de leito fixo. No ciclo utilizando amido houve uma maior ocorrência de filamentos em comparação com os outros ciclos, enquanto que vibrios foram encontrados predominantemente nos ensaios com óleo de soja. A maior variabilidade morfológica foi observada no ciclo utilizando esgoto sintético, inclusive a presença de protozoários foi verificada. Esta maior diversidade pode estar relacionada com a maior complexidade do meio.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no trabalho permitem as seguintes conclusões:

- O substrato influencia na dinâmica de aderência, pois constatou-se diferentes padrões de colonização em relação à quantidade de biomassa acumulada, polímeros extracelulares excretados e morfologias dos organismos encontrados. No entanto, observou-se, para todos os ciclos, que a etapa inicial de aderência era quase exclusivamente devida à fixação de bacilos às matrizes de poliuretano, através da produção de polímeros extracelulares.
- O ciclo utilizando esgoto sintético apresentou uma maior quantidade de biomassa aderida às matrizes de poliuretano (2,07 SVT/Espuma no 24º dia) em relação aos demais ciclos (de 1,52 a 1,69 SVT/Espuma).
- A colonização das matrizes de poliuretano para os ciclos utilizando glicose, amido, extrato de carne e esgoto sintético como substrato, se deu de maneira muito parecida podendo ser descrita segundo um modelo sigmoidal. A colonização do ciclo alimentado com óleo de soja seguiu um modelo de crescimento exponencial.
- O valor médio de velocidade de colonização, levando em conta todos os casos estudados, foi de $0,056 \pm 0,004$ g SVT/g Espuma. Os valores máximos de velocidade de colonização foram encontrados entre o 13º e 17º dia de operação, exceção feita ao ciclo alimentado com óleo de soja o qual apresentou comportamento distinto.

- Os ciclos estudados apresentaram uma grande variabilidade morfológica em relação ao substrato utilizado. Todavia, uma grande ocorrência de organismos semelhantes a *Methanosaeta* foi verificada em todos os ciclos, principalmente em relação a *Methanosarcina*. A maior diversidade morfológica foi observada no ciclo utilizando esgoto sintético, sendo que este fato está vinculado, provavelmente, à maior complexidade do meio.
- A colonização inicial das matrizes de poliuretano se deu preferencialmente pela aderência de bacilos, os quais foram os organismos pioneiros na formação do biofilme para todos os substratos estudados.
 - O fenômeno de excreção de polímeros pareceu ser de fundamental importância no processo de colonização de matrizes de poliuretano.
 - A produção de polímeros sofreu uma grande influência do substrato utilizado na etapa de aderência inicial, apresentando comportamentos diferenciados para cada substrato.
 - Os polímeros excretados podem estar ligados ao entupimento de reatores de leito fixo, permanecendo no interior dos suportes e nos interstícios do leito, causando problemas operacionais nos reatores de leito fixo.
 - As rápidas partidas observadas em trabalhos utilizando reatores de leito fixo e espuma de poliuretano como suporte podem estar vinculadas à rápida aderência dos organismos em todos os ciclos estudados.

7. SUGESTÕES

Sugestões para trabalhos futuros:

- Estudar a influência da velocidade na colonização de matrizes de poliuretano.
- Realizar um estudo, utilizando reatores de leito fixo em módulos em série, variando a posição dos módulos, com o acompanhamento da quantidade de biomassa aderida e polímeros extracelulares excretados.
- Realizar pesquisa visando obter os parâmetros de crescimento de biomassa para reatores de leito fixo, utilizando espuma de poliuretano como suporte.
- Utilizar técnicas de cromatografia, líquida e gasosa, para a análise dos produtos intermediários da degradação anaeróbia dos substratos estudados.
- Utilizar técnicas de biologia molecular para a identificação dos organismos presentes no consórcio microbiano.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.W.W. (1995). Thermophilic archaea: an overview. In: ROBB, F.T.; PLACE, A.R. (eds). *Archaea - a laboratory manual: Thermophiles*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, p.3-7.
- ALIBHAI, K.R.K.; FORSTER, C.F. (1986). An examination of the granulation process in UASB reactors. *Environmental Technology Letters*, v. 7, p. 193-200.
- ALVES, M.M.; PEREIRA, M.A.; NOVAIS, J.M.; POLANCO, F.F.; MOTA, M. (1999). A new device to select microcarriers for biomass immobilization: application to an anaerobic consortium. *Water Environment Research*, v. 71, p. 209-217.
- ANDERSEN, D.R.; SCHMID, L.A. (1985) Pilot plant study of an anaerobic filter for treating wastes from a complex slaughterhouse. In: Proceedings of the 40th Industrial Waste Conference, Purdue University, Purdue, 1985.
- ANDERSON, G.K.; KASAPGIL, B.; INCE, O. (1994). Microbiological study of two-stage anaerobic digestion during start-up. *Water Research*, v. 28, p. 2383-2392.
- APHA, AWWA, WPCF (1985). *Standard methods for examination of water and wastewater*. 16^a. ed, American Public Health Association/American Water Works Association/ Water Environment Federation, Washington, USA.
- ARAÚJO, J.C. (1994). *Acompanhamento da evolução do biofilme e caracterização química e biológica em reator de leito fluidificado tratando esgoto sanitário sintético*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

- AZAM, F.; FENCHEL, T.; FIELD, J.G.; GRAY, J.S.; MEYER-REIL, L.A.; THINGSTAD, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, v. 31, p. 257-263.
- de BEER, D.; O'FLAHARTY, V.; THAVEESRI, J.; LENS, P.; VERSTRAETE, W. (1996). Distribution of extracellular polysaccharides and flotation of anaerobic sludge. *Applied Microbiology and Technology*, v. 46, p. 197-201.
- BRITZ, T.J., SPANGENBERG, G., VENTER, C.A. (1994). Acidogenic microbial species diversity in anaerobic digesters treating different substrates. *Water Science and Technology*, v.30, p. 55-61.
- BULL, M.J. (1991). *Progress in industrial microbiology*. New York, Elsevier Scientific Publishing Company.
- BRYERS, J.D. (1988). Modelling biofilm accumulation. In: BAZIN, M. J.; DROSSER, J. I. (eds). *Physiological models in microbiology*. Boca Raton, CRC Press, v. 2, p. 109-144 (Series in Mathematical Models in Microbiology).
- CABRAL, A.K.A., (2000) Avaliação do desempenho e estabilidade de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), submetido ao aumento progressivo na concentração de matéria orgânica afluyente e a cargas de choque orgânicas. São Carlos, 2000. 124p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- CALZADA, J.F.; ARRIOLA, M.C., CASTAÑEDA, J.E., GODOY J.E.; ROLZ C. (1984). Methane foam coffee pulp juice: experiments using polyurethane foam reactors, *Biotechnology Letters*, v. 6, p. 385-388.
- CANHOS, V.P.; VAZOLLER, R.F. (1999). *Biodiversidade do Estado de São Paulo: Microrganismos & Vírus*. São Paulo: FAPESP, p. 3-23.
- CHENG, S.S.; HUANG, S.Y.; LAY, J.J.; TSAI, P.S.; CHO, L.T. (1992). Population dynamics of attached biofilm in anaerobic fluidized bed pilot plant. *Water Science and Technology*, v. 36, p. 503-510.

- COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G.; CHENG, K.J. (1978). How bacteria stick. *Science American*, v. 238, p. 86-95.
- COSTERTON, J.W.; ANWAR, J.H. (1994). *Pseudomonas aeruginosa*: the microbe and pathogen. In: BALCH, A.; SMITH, P. (ed). *Pseudomonas aeruginosa* infections and treatment. New York, Marcel Dekker, p. 1-18.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 49, p. 711-745.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z. (1997). The biofilm lifestyle. *Advances in Dental Research*, v. 11, n.1, p. 192-195.
- CURDS, C.R. (1992). *Protozoa and the water quality*. Cambridge, Cambridge University Press.
- DEL NERY, V. (1987). Utilização de lodo anaeróbio imobilizado no start-up de reatores UASB. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- DEL NERY, V. (1993). Digestão anaeróbia em duas fases com culturas mistas acidogênicas e metanogênicas imobilizadas separadamente em gel Ágar. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- DROSTE, R.L., KENNEDY, K.J. (1987). Steady state kinetics of anaerobic downflow stationary fixed film reactors. *Water Science and Technology*, v. 19, p. 275-285.
- DUBOIS, M.; GUILLES K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS P.A.; SMITH. F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350-356.
- FAN, L.S. (1989). *Gas-Liquid-Solid Fluidization Engineering*. New York, Butterworths Publishers.

- FENCHEL, T.; FINLAY, B.J. (1991). The biology of free living anaerobic ciliates. *European Journal of Protistology*, v. 26, p. 210-215.
- FORESTI, E.; ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; DEL NERY, V. (1995). Horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor for paper industry wastewater treatment. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 12, p. 235-239.
- FYNN, G.H.; WHITMORE, T.N. (1984). Retention of methanogens in colonized reticulated polyurethane foam biomass support particle. *Biotechnology Letters*, v.6, n.2, p. 81-86.
- GILLER, P.S. (1984). *Community structure and the niche*. Londres: Chapman & Hall.
- GIZGEN, H.J., SCHOENMAKERS, T.J.M., CAERTELING, C.G.M., VOGELS, G.D. (1988). Anaerobic degradation of papermill sludge in a two-phase digester containing rumen microorganisms and polyurethane foam. *Biotechnology Letters*, v. 10, n.1, p. 61-66.
- GODINHO, M.J.L.; SELEGHIM, M.H.R. (1999). Diversidade no reino protista: protozoários de vida livre. In: CANHOS, V.P.; VAZOLLER, R.F. (eds). *Biodiversidade do Estado de São Paulo: Microrganismos & Vírus*. São Paulo: FAPESP. Cap. 9, p. 84-91.
- GROTENHUIS, J.T.C.; SMITH, M.; PLUGGE, C.M.; YUANSHENG, X.; LAMMEREN, A.A.M.; STAMS, A.J.M., ZEHNDER, A.J.B. (1991). Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p.1942-1949.
- GUIOT, S.R., PAUSS, A., COSTERTON, J.W. (1991). A structure model of the anaerobic granule consortium. *Water Science and Technology*, v. 25, p. 1-12.
- HARADA, H.; ENDO, G.; TOHYA, Y.; MONOMOY, K. (1988). High rate performance and its related characteristics of granulated sludges in UASB reactors treating various wastewaters. In: HALL, E.R.; HOBSON, P.N. (eds). *Proceedings of the 5th International Symposium on Anaerobic Digestion*. Bologna, Itália. Oxford: Pergamon Press, p. 22-26.

- HAZLEWOOD, G.P.; DAWSON, R.M.C. (1979). Characteristics of a lipolytic and fatty acid-requiring *Butyrivibrio* sp. isolated from the ovine rumen. *Journal of Genetical Microbiology*, v. 112, p. 15-27.
- HENZE, M.; HARREMOËS, P. (1983). Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors - a literature review. *Water Science and Technology*, v.15, p.1-101.
- HUYSMAN, P.; VAN MEENEM, P.; VAN ASSCHE, P.; VERSTRAETE, W. (1983). Factors affecting the colonization of non porous and porous packing material in model up-flow methane reactors. *Biotechnology Letters*, v. 5, p. 643-648.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M; PACE, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, v.180, p. 4765 -4774.
- HUNGATE, R.E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: NORRIS, O.R.; RIBBOWS, D.W. (eds). *Methods in Microbiology*. New York, Academic. Vol. 3b, p. 117-132.
- HWANG, S.H., HANSEN, C.L., STEVENS, D.K. (1992). Biokinetics of an up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating whey permeate. *Bioresource Technology* v. 41, p.223-230.
- INAMORI, Y.; MATSUSIGE, K.; SUDO, R.; CHIBA, K.; KIKUSHI, H.; EBISUNO, T. (1989). Advanced wastewater treatment using an immobilized micro organism/biofilm two step process. *Water Science and Technology*, v. 21, p. 1755-1758.
- JAIN, M.; ZIEKUS, J.G.(1985). A defined starter culture for methanation of proteinaceous wastes. In: ANTONOPOULOS, A.A. (ed). *Biotechnological advances in processing municipal wastes for fuels and chemicals*. Argonne National Laboratory, Argonne, p. 125-129.
- JIA, X.S.; FURAMAI, H.; FANG, H.H. (1996). Extracellular polymers of hydrogen-utilizing methanogenic and sulfate-reducing sludges. *Water Research*, v. 30, p. 1439-1444.

- KARUBE, I.; KURIYAMA, S.; MATSUGANA, T.; SUZUKI, S. (1980). Methane production from wastewaters by immobilized methanogenic bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 22, p. 847-857.
- KASPAR, H.F.; WUHRMANN, K. (1978). Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digested sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 35, p. 1-7.
- KATO, M.T.; ANDRADE NETO, C.O.; CHERNICHARO, C.A.L.; FORESTI, E.; CYBIS, L.F. (1999). Configurações de reatores anaeróbios. In: CAMPOS, J.R. (org). *Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo*. Rio de Janeiro, PROSAB. Cap. 3, p.53-99.
- KAWASE, M.; NOMURA, T.; NAJIMA, T. (1989). An anaerobic fixed bed reactor with a porous ceramic carrier. *Water Science and Technology*, v.21, p.77-86.
- KENNEDY, K.J.; HAMODA, M.F.; DROSTE, R.L. (1987). Kinetics of dowflow anaerobic attached growth reactors. *Journal of Water Pollution Control Federation*, v. 59, p. 212-221.
- KÖNIG, H.; STETTER, K.O. (1989). Archaeobacteria. In: *Bergey's Manual of Bacteriology*, vol.3, seção 25.
- KUS, F.; WIESMANN, U. (1995). Degradation kinetics of acetate and propionate by immobilized anaerobic mixed cultures. *Water Research*, v. 29, p. 1437-1443.
- LEE, J.J.; HUTNER, S.H.; BOVEE, E.C. (1985). An illustrated guide to the Protozoa. Lawrence, Kansas, Society of Protozoologists.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. (1993). *Principles of biochemistry*. New York, Worth.
- LETTINGA, G. (1995). Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 67, p. 3-28.

LOGAN, N. A. (1994). *Bacterial systematics*. Oxford, Blackwell Scientific Publications.

van LOODSTRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; ZEHNDER, A.J.B. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews*, v. 54, p. 75-87.

van LOODSTRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J.B. (1987). Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 1898-1901.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (1997). *Biology of microorganisms*. 8^a ed., New Jersey, Prentice Hall. p. 606-768.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (2000). *Biology of microorganisms*. 9^a ed., New Jersey, Prentice Hall.

MAIDAK, B.L.; OLSN, G.J.; LARSEN, N.; OVERBEEK, R.; MCCAUGHEY, M.J.; WOESE, C.R. (1997). The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*, v. 25, p. 109-110.

MARSHALL, K.C. (1996). Adhesion as a strategy for access to nutrients. In: FLECHTER, M. (ed.) *Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity*. New York, Wiley Liss. Cap. 3, p. 59-88.

McCARTY, P.L.; SMITH, D.P. (1986). Anaerobic wastewater treatment. *Environmental Science and Technology*, v. 20, p. 1200-1206.

McINERNEY, M.J.; BRYANT, M.P.; PFENNIG, N. (1979). An anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Archea Microbiology*, v. 122, p. 129-135.

McINERNEY, M.J.; BRYANT, M.P. (1981). Review of methane fermentation fundamentals. In: WISE, D.L. (ed). *Fuel gas production from biomass*. Boca Raton, CRC Press. Vol. 1, p. 19-47.

- McINERNEY, M.J. (1988). Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. In: ZEHNDER, A.J.B. *Biology of anaerobic microorganisms*. New York, Wiley-Liss.
- METCALF & EDDY, INC (1991). *Wastewater Engineering – Treatment, Disposal and Reuse*. 3^a ed., New York, McGraw Hill.
- MORGAN, J.W.; FORSTER, C.F.; EVISON, L.M. (1990). A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges. *Water Research*, v. 24, p. 743-750.
- MULDER, A.; WALSTRA, P. (1974). *The Milk Fat Globe*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, UK.
- MÜLLER, M. (1980). The hydrogenosome. In: GOODWAY, G.W.; LLOYD, D.; TUNCI, A.P.J. (eds). *The eukariotic microbial cell*. Cambridge, Cambridge University Press, p. 127-142.
- NATION, J. L. (1983). A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. *Staining Technology*, v.58, p. 347-351.
- NORTH, A.C.T.; ATWOOD, T.K. (1991). *Protein structure*. Burlington, CRB.
- PASSOW, U.; ALLDREDGE, A.L. (1995). A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). *Limnology Oceanografic*, v. 40(7), p. 1326-1335.
- PETERSEN, G.L. (1977). A simplification of the protein assay of Lowry which is more generally applicable. *Analytical Chemistry*, v. 83, p. 346-353.
- PETRUY, R.; LETTINGA, G. (1997). Digestion of a fat-milk emulsion. *Bioresource Technology*, v. 61, p. 141-149.
- QUARMBY, J.; FORSTER, C.F. (1996). A comparative study of the structure of thermophilic and mesophilic anaerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 493-498.

- RASKIN, L.; RITTMANN, B. E.; STAHL, D.A. Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n.10, p. 3847-3857.
- RITTMANN, B.E.; CRAWFORD, L.; TRUCK, C.K; NAMKUNG, E. (1986). In situ determination of kinetic parameters for biofilm: isolation and characterization of oligotrophic biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 28, p.1753-1760.
- ROBINSON, R. W.; AKIN, D.E.; NORDSTEDT, R.A.; THOMAS, M.V.; ALDRICH, H.C. (1984). Light and electron microscopic examinations of methane producing biofilms from anaerobic fixed- bed reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 48, p. 127-136.
- ROSS, W.R. (1984). The phenomenon of sludge pelletisation in the anaerobic treatment of maize processing waste. *Water SA*, v. 10, p.197-203.
- SAM-SOON, P.A.L.N.S.; LOEWENTHAL, R.E.; DOLD, P.L.; MARAIS, G.R. (1988). Pelletization in upflow anaerobic sludge bed reactors. In: HALL, E.R.; HOBSON, P.N. (eds). Proceedings of the 5th International Symposium on Anaerobic Digestion. Bologna, Itália. Oxford: Pergamon Press, p. 55-60.
- SAMSON, R.; van der BERG, B.; PETERS, R; HADE, C. Dairy wastewater treatment using industrial-scale fixed-film and upflow sludge bed anaerobic digesters: design and start-up experience. In: Proceedings of the 40th Industrial Waste Conference, Purdue University, Purdue, 1985.
- SANCHEZ, J.M.; ARIJO, S.; MUÑOZ, M.A.; MORIÑIGO, M.A.; BORREGO, J.J. (1994). Microbial colonization of different support materials used to enhance the methanogenic process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 41, p. 480-486.
- SARTI, A.; VIEIRA, L. G. T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (2001). Influence of the Liquid-Phase Mass Transfer on the Performance of a Packed-Bed Bioreactor for Wastewater Treatment. *Bioresource Technology*, no prelo.

- SHERR, E.B.; SHERR, B.F. (1994). Bacterivory and herbivory: key roles of phagotrophic protists in pelagic food webs. *Microbial Ecology*, v. 28, p. 223-235.
- SLADÉČEK, V. (1973). System of water quality from the biological point of view. *Ergebnisse der Limnologie*, v. 7, p. 1-218.
- SOWERS, K.R. (1995). Methanogenic Archaea: an overview. In: SOWERS, K.R.; SCHREIER, H.J. (eds). *Archaea - a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 3-13.
- SPEECE, R.E. (1996). *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Nashville, Archae Press.
- von SPERLING, M. (1997). *Princípios básicos de tratamento de esgotos*. Belo Horizonte, DESA/UFMG.
- STACHEBRANDT, E.; RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification systems, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 47, p. 479-491.
- TOMMASO, G. (1999). *Estrutura, caracterização e cinética de lodo anaeróbio imobilizado em espuma de poliuretano tratando substrato sintético contendo proteína como única fonte de carbono*. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- TEBBUT, T.H.Y. (1977). *Principles of water quality control*. 2a ed., Oxford, Pergamon Press.
- TORRES, P. (1992). *Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários*. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- TREVATHAN, C.A.; SMIBERT, R.M.; GEORGE, H.A. (1982). Lipid catabolism of cultivated treponemes. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 28, p. 672-678.

- VARESCHE, M.B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; VAZOLLER, R.F.; FORESTI, E. (1997). Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 48, n.4, p.543-538.
- VAZOLLER, R.F. (1995). *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operando com vinhaça sob condições termofílicas*. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- VEIGA, M.C.; JAIN, M.K.; WU, W-M.; HOLLINGSWORTH, R.I.; ZEIKUS, J.G. (1997). Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 403-407.
- VOGELS, G.D. (1980). Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 40, p. 608-612.
- WOESE, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, v. 51, p. 221-271.
- WOLF, M.; WERNER, M.; ULRICH, S.; KARLHEINZ, K. (1998). Population dynamics in anaerobic wastewater reactors: modelling an in situ characterization. *Water Research*, v. 33, n. 10, p. 2392-2402.
- WOLFAARDT, G.M.; LAWRENCE, J.R.; ROBARTS, R.D.; CALDWELL, D.E. (1994). The role of interactions, sessile growth and nutrient amendment on the degradative efficiency of a bacterial consortium. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 331-340.
- ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; FORESTI, E. (1994). Reator anaeróbio de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. *Revista Brasileira de Engenharia – Cadernos de Engenharia Química*, v. 11, p. 33-42.
- ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; FORESTI, E. (1996). Cell wash-out and external mass transfer resistance in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Water Research*, v.30:, p. 2435-2439.

- ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; FORESTI, E. (1997). Spatial and temporal variations in monitoring performance parameters in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Water Research*, v. 31, p.1760-1766.
- ZAIAT, M.; PASSIG, F.H.; FORESTI, E. (2000). Treatment of Domestic Sewage in Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Biomass (HAIB) Reactor. *Environmental Technology*, v.21, p.1139-1145.
- ZELLNER, G.; VOGEL, P.; KNEIFEL, H.; WINTER, J. (1987). Anaerobic digestion of whey and permeate with suspended and immobilized complex and defined consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 306-314.
- ZELLNER, G.; GEVEKE, M.; MACARIO, E. C.; DIEKMANN, H. (1991). Population dynamics of biofilm development during start-up of butyrate-degrading fluidized-bed reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 36, p. 404-409.
- ZELLNER, G.; MARACAILO, A.J.L.; MARACARIO, E.C. (1996). Microbial subpopulations in the biofilm attached to the substratum and in the free flocs of a fixed-bed anaerobic bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, p. 443-449.
- ZHANG, X.; BISHOP, P.L.; KINKLE, B.K. (1999). Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Water Science and Technology*, v. 39, p. 211-218.